

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie

Studijní obor: Biomedicína



**MUDr. Pavel Šnajdr**

Genetická regulace vývoje končetiny

Genetic Regulation of Limb Development

Typ závěrečné práce: Disertační

Vedoucí závěrečné práce: Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.  
Školitel konzultant: MUDr. František Liška, PhD

Praha 2010

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – Nesouhlasím\*

V Praze 30. 5. 2010

Pavel Šnajdr

Podpis

\*Nehodící se škrtnete

**Identifikační záznam:**

ŠNAJDR, Pavel. *Genetická regulace vývoje končetiny [Genetic Regulation of Limb Development]*. Praha, 2010. Počet stran 46, počet příloh 6. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav. Vedoucí práce Grim, Miloš.

**Abstrakt:**

*Lx* u SHR.*Lx* potkana se u homozygota manifestuje jako preaxiální polydaktylie zadní končetiny. Ukázali jsme, že delece 2,964 bp v intronu 2 genu *Plzf* (Promyelocytic leukemia zinc finger) je jediným kandidátem na *Lx*. Tato delece odstraňuje nejzakonzervovanější CNE (conserved noncoding element) s předpokládanou regulační funkcí pro expresi *Plzf*. Použitím *in situ* hybridizace jsme našli redukovanou expresi *Plzf* v končetinách *Lx/Lx* a změněnou expresi některých *Plzf* regulovaných genů, *Hoxd10–13* a *Bmp2*. Exprese *Shh* je beze změny.

*hd* u potkana se u homozygota manifestuje redukcí či ztrátou prstů II a III na předních i zadních končetinách a postižením spermatogeneze vedoucí k neplodnosti samců. Zjistili jsme, že *hd* mutace je způsobena inzercí endogenního retrovirového úseku do intronu 10 genu *Centrob*, která vede k translaci zkráceného proteinu centrobin. *In situ* hybridizace ukázala, že exprese *Sox9*, markeru kondenzace chrupavky a Bmp receptoru *Bmpr1b* chybějí v distální části základů prstů II a III. Při studiu spermatogeneze jsme lokalizovali centrobin (protein genu *Centrob*) v centrozómu, manžetě, a okrajovém prstenci akropalád. Mutované spermatidy mají poškozený aparát spojující hlavičku a ocas, což vede k jejich dekapitaci během vývoje.

Prokázali jsme zřetelnou expresi *c-myb* ve vyvíjející se končetině. Exprese byla nejsilnější ve stadiu 13,5 dpc a 14,5 dpc podél vyvíjejících se základů paprsků prstů obou končetin, pravděpodobně ve vyvíjejícím se perichondriu. Studium fenotypu končetin *c-myb* *-/-* stadií 12,5-14,5 dpc neukázalo žádný rozdíl v porovnání s WT kontrolami, *c-myb* tedy není nezbytný pro vývoj končetiny těchto stadií.

**Klíčová slova:**

vývoj končetiny, polydaktylie, oligodaktylie, hypodaktylie, spermatogeneza, potkan, myš, *c-myb*, *Hox*, *Plzf*, *Centrob*

**Abstract:**

*Lx* in SHR.*Lx* rat manifests in homozygotes as hindlimb preaxial polydactyly.

We showed that a 2,964-bp deletion in *Plzf* (Promyelocytic leukemia zinc finger) intron 2 is the only candidate for *Lx*. The deletion removes the most deeply conserved CNE with putative regulatory influence on *Plzf* expression. Using *in situ* hybridization we found reduced expression pattern of *Plzf* in *Lx/Lx* limb and anterior expansion of expression domains of *Plzf* targets *Hoxd10–13* genes and *Bmp2*, in the absence of ectopic *Shh* expression.

Rat *hd* manifests in homozygotes as reduction or loss of digits II and III on both hind and forelimb and impairment of spermatogenesis leading to male infertility. We showed that *hd* mutation is caused by an insertion of an endogenous retrovirus into intron 10 of the *Cntrob* gene resulting in the translation of a truncated protein. *In situ* hybridization showed that expression of cartilage condensation marker *Sox9*, and Bmp receptor *Bmpr1b* is absent from the distal parts of the digit condensations II and III. Studying spermatogenesis we showed that centrobins (protein of *Cntrob*) localizes to the centrosome, manchette, and the marginal ring of the spermatid acroplaxome. Mutant spermatids show a disruption of head-tail coupling apparatus leading to spermatid decapitation .

We demonstrated distinct expression pattern of *c-myb* in developing limbs. The pattern was robust at stages 13,5 dpc and 14,5 dpc alongside of prospective digit anlagen of both limbs, probably in developing perichondrium. Studying *c-myb* <sup>-/-</sup> limb phenotype of stages 12,5-14,5 dpc we did not observe any phenotypical difference in comparison to WT controls indicating that *c-myb* is dispensable for this stage of limb development.

**Key words:**

limb development, polydactyly, oligodactyly, hypodactyly, spermatogenesis, rat, mouse, *c-myb*, *Hox*, *Plzf*, *Cntrob*

## **Grantová podpora**

Práce shrnuté v této disertaci byla podpořena granty MSMT 0021620806, LC06061, AVOZ 50450515, GA304/06/0116, GA304/03/0462 GP301/07/P178, grant Karlovy Univerzity: 260510

## **Poděkování**

Rád bych předně poděkoval Prof. M. Grimovi, mému školiteli. Jako vedoucí Laboratoře pro molekulární embryologii rozvíjí užitím současných metod na Anatomickém ústavu 1.LF UK již tradiční zájem o studium embryonálního vývoje. Děkuji mu za cenné rady a připomínky, neméně pak za finančně-organizační zabezpečení chodu celé laboratoře. Za cenné intelektuální stimuly dále děkuji Františkovi Liškovi z Ústavu biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN, který se stal i mým školitelem konzultantem a Elišce Krejčí z Anatomického ústavu 1.LF UK. Pro mne klíčová byla i jejich rutinní znalost metod genetického inženýrství.

Za pomoc s mnoha laboratorními postupy a metodami, předně s metodou RNA *in situ* hybridizace, děkuji především paní Evě Kluzákové, naší dlouholeté a vynikající laborantce. S prací na dílčích úkolech projektu jsem dále spolupracoval s dalšími členy Laboratoře pro molekulární embryologii, s Markétou Pleschnerovou a Michalem Tůmou, kterým také velmi děkuji.

Za seznámení se světem transkripčního faktoru c-Myb děkuji M. Dvořákovi a M. Dvořákové z Ústavu molekulární biologie a genetiky AV ČR.

Za poskytnutí myší s vyřazeným genem *c-myb* děkuji Prof. Robertu Ramsay z Peter MacCallum Cancer Research Center, Melbourne, Australia.

### **Používané zkratky a definice některých pojmů**

AER - apikální ektodermový hřeben, apical ectodermal ridge

akrozóm – specifická organela spermií obsahující enzymy štěpící obal vajíčka

akroplaxóm (acroplaxome) – cytoskeletální struktura spojující akrozom a jádro spermie

Bmp – morfogenetický faktor kosti, bone morphogenetic protein

Bmpr – receptor Bmp

BN – potkaní kmen Brown Norway

dpc - days post coitum, označení stáří embrya

Fgf – růstový faktor fibroblastů, fibroblast growth factor

Fgfr – receptor Fgf

*hd* – hypodaktylní mutace u potkan; je odlišná od *Hd* mutace u myši

*Lx* – polydaktylní mutace u potkana; je odlišná od *lx* mutace u myši

Plzf - promyelocytic leukemia zinc finger

Shh – sonic hedgehog

SHR – potkaní kmen Spontaneously Hypertensive Rat

spermatogeneze – vývoj spermie, proces diferenciací spermatogonie ve spermii

spermioogeneze – proces diferenciací spermatid ve spermii, jedná se o konečnou fázi spermatogeneze

WM ISH – *in situ* hybridizace v celých embryích, whole mount *in situ* hybridisation

WT – jedinec který nenesé zkoumanou mutaci, wild type

## Obsah

<b>Prohlášení</b>	ii
<b>Identifikační záznam:</b>	iii
<b>Grantová podpora</b>	v
<b>Poděkování</b>	v
<b>Používané zkratky a definice některých pojmů</b>	vi
<b>Obsah</b>	vii
<b>1. Summary</b>	1
<b>2. Úvod</b>	3
<b>3. Přehled problematiky</b>	5
<b>3.1. Genová regulace embryonálního vývoje končetin</b>	5
3.1.1 Vývoj základních os končetiny v trojrozměrném prostoru	5
3.1.2 <i>Hox</i> geny	7
3.1.3 <i>Shh</i>	8
3.1.4 <i>Fgf</i> geny	9
3.1.5 <i>Bmp</i> geny	10
3.1.6 <i>Sox</i> geny	11
3.1.7 <i>Plzf</i>	12
3.1.8 <i>Cntrob</i> ( <i>Lip8</i> , <i>NIP2</i> )	13
3.1.9 <i>c-myb</i>	13
<b>3.2. Polydaktylie, hypodaktylie</b>	15
<b>3.3. Geneticky podmíněné vady končetin u člověka</b>	15
<b>4. Cíle práce</b>	17
<b>4.1. Vývoj končetiny u polydaktylního <i>Lx</i> potkana a u oligodaktylního <i>Hd</i> potkana</b>	17
<b>4.2. Role <i>c-myb</i> při vývoji končetiny myši</b>	17
<b>5. Modelové organismy a vybrané metody</b>	18
<b>5.1. Modelové organismy</b>	18
<b>5.2. <i>In situ</i> mRNA hybridizace celých embryí</b>	20
5.2.1. <i>Sondy</i> použité na mRNA ISH	20
<b>5.3. Imunohistochemie a elektronová mikroskopie</b>	21
<b>5.4. Barvení skeletu pomocí alizarinové červeně a alciánové modři</b>	22

<b>6. Výsledky</b>	
<b>6.1. Vývoj končetiny u polydaktylního <i>Lx</i> potkana</b>	23
<b>6.2. Vývoj končetiny a spermatogeneze u hypodaktylního <i>hd</i> potkana</b>	27
<b>6.3. Role <i>c-myb</i> při vývoji končetiny myši</b>	32
<b>7. Diskuse</b>	34
<b>7.1. Vývoj končetiny u polydaktylního <i>Lx</i> potkana</b>	34
<b>7.2. Vývoj končetiny a spermatogeneze u hypodaktylního <i>hd</i> potkana</b>	36
<b>7.3. Role <i>c-myb</i> ve vývoji končetiny myši</b>	37
<b>7.4. Proč právě pět prstů?</b>	38
<b>8. Souhrn hlavních výsledků a závěrů disertace</b>	39
<b>9. Literatura použitá v disertaci</b>	40
<b>10. Seznam publikací autora</b>	46
<b>11. Přílohy</b>	



## 1. Summary

### The results are summarized as follows:

a) *Lx* in SHR.*Lx* rat manifests in homozygotes as hindlimb preaxial polydactyly. This SHR.*Lx* phenotype strikingly resembles *Plzf*<sup>-/-</sup> mouse phenotype. *Lx* allele was previously mapped to a chromosome 8 segment containing also the *Plzf* (promyelocytic leukemia zinc finger protein) gene. However, the *Plzf* coding sequence is intact in the *Lx* mutants.

Using linkage mapping in F2 hybrids, we downsized the segment containing *Lx* to 155 kb and sequenced conserved noncoding elements (CNEs) inside. A 2,964-bp deletion in *Plzf* intron 2, never detected in control animals, is the only candidate for *Lx*. The deletion removes the most deeply conserved CNE in the 155-kb segment, suggesting a regulatory influence on *Plzf* expression.

Using *in situ* hybridization we studied the expression pattern of *Plzf* and found a later onset and decrease of *Plzf* expression in *Lx/Lx* limb. Using quantitative polymerase chain reaction, we quantified decrease of *Plzf* expression in *Lx/Lx* limb buds compared to both +/*Lx* and WT.

It was shown in mouse that *Plzf* influences limb development as a direct repressor of posterior *HoxD* genes in anterior part of limb bud. Correspondingly with this finding we found anterior expansion of expression domains of *Plzf* targets, *Hoxd10–13* genes and *Bmp2*, in the absence of ectopic *Shh* expression.

b) Rat *hd* is an autosomal recessive mutation manifesting in homozygotes as reduction or loss of digits II and III on both hind and forelimb and impairment of spermatogenesis leading to male infertility. We mapped the *hd* allele to a short segment of chromosome 10, and then showed that *hd* mutation is caused by an insertion of an endogenous retrovirus into intron of the *Cntrob* gene. The retroviral insertion in *hd* mutant rats disrupts the normal splicing of *Cntrob* transcripts and results in the translation of a truncated protein.

*Cntrob* was not published to influence limb development yet. *In situ* hybridization showed no changes in several important limb patterning genes (*Shh*, *Fgf8*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*). However, we found that expression of cartilage condensation marker *Sox9*, and *Bmp* receptor *Bmpr1b* (acting as an upstream activator of *Sox9* expression) is absent from the distal part of the digit condensations II and III. The failure of the chondrogenic

condensations to extend towards the subepithelial mesenchyme may reduce the size of digit primordia and underlie the subsequent loss of phalanges and reduction of metacarpals/metatarsals in *hd* rats. Studying spermatogenesis we showed that centrobilin localizes to the centrosome, manchette, and the marginal ring of the spermatid acroplaxome, where it interacts with keratin 5- containing intermediate filaments. Mutant spermatids show a defective acroplaxome marginal ring and separation of the centrosome from its normal attachment site of the nucleus. This separation correlates with a disruption of head-tail coupling apparatus, leading to spermatid decapitation during the final step of spermiogenesis and the absence of sperm in the epididymis.

c) We demonstrated expression of *c-myb* in diverse tissues of developing embryos of age 12.5 - 14.5dpc. Our results confirm previously published data about expression in non hematopoietic tissues such as: liver, retina, nasal epithelium and vomeronasal organ, whisker follicle, CNS. We also showed distinct expression pattern of *c-myb* in developing limbs which has not been published yet. The pattern was robust at stages 13,5 dpc and 14,5 dpc alongside of prospective digit anlagen of both limbs, probably in developing perichondrium. Studying *c-myb* <sup>-/-</sup> limb phenotype of stages 12,5 -14,5 dpc we did not observe any phenotypical difference in comparison to WT controls indicating that *c-myb* is dispensable for this stage of development. Because *c-myb* <sup>-/-</sup> embryos die at age around 15 dpc due to general anemia, we can not study phenotype of older stages. We can conclude that despite its strong and distinct expression pattern *c-myb* is dispensable for early stage of limb development.

## 2. Úvod

Studium embryonálního vývoje obecně i vývoje končetiny konkrétně má na Anatomickém ústavu 1. LF UK dlouhou tradici.

R. Čihák sledoval původ a vývoj svalů končetiny v průběhu ontogeneze člověka. Výsledky své mnohaleté experimentální činnosti shrnul v dodnes citované monografii z roku 1972 (Cihak, 1972a). Čihák byl také první, kdo popsal morfologii a embryonální vývoj končetiny polydaktylního *Lx* potkana (Cihak, 1972b), u kterého se nám o 36 let později podařilo identifikovat mutaci, která je za tento fenotyp zodpovědná.

V. Seichert vypracoval originální metodu lineárního značkování umožňující mu sledovat a kvantifikovat růst jednotlivých částí končetinového pupenu v různých etapách vývoje. Ve spolupráci s Rychterem detailně studovali vývoji cév v končetinách. Své práce na tato témata shrnul Seichert v monografii z roku 1988 (Seichert, 1988). O. Mrázková studovala na lidských končetinách vztah cév k vývoji svalů (Mrázková, 1986), I. Dylevský se zabýval vývojem svalů lidské končetiny (Dylevsky, 1986). Precizní zpracování unikátního lidského materiálu umožnilo M. Doskočilovi detailně popsat vývoj některých velkých kloubů u člověka (Doskocil, 1984).

Práce zmíněných a dalších autorů v průběhu 70. a 80. let v podstatě do dokonalosti dovedla popis vývoje končetiny, pouhá deskripce však začala narázet své limity. Zavedení postupů molekulární biologie koncem 80. a počátkem 90. let přineslo nový impuls pro výzkum vývojových procesů.

Na práce Čiháka týkající se původu a vývoje svalů v končetinách navázal M. Grim (Franz et al., 1993; Grim, 1970), který dále s pomocí metod molekulární biologie hledal odpovědi i na další otázky týkající se vývoje končetiny. Vedle shrnujících publikací porovnávajících vývoj horní a dolní končetiny u člověka (Hinrichsen et al., 1994) se experimentálně zabýval otázkou osídlení základu končetiny buňkami neurální lišty (Grim and Halata, 2000; Grim and Christ, 1993) či původem a diferenciací endotelu končetinových cév (Brand-Saberi et al., 1995).

Pro mou práci má velký význam i publikace D. Sedmery mapující rozsah apoptózy ve vyvíjející se končetině *Lx* potkana (Sedmera et al., 1998).

Vývoj končetiny je stále aktuální téma vývojové biologie i klinické medicíny. Nejde jen o pochopení vývoje vlastní končetiny, ale též o obecné porozumění realizace vzorce (šablony, pattern), podle kterého je orgán vystavěn, o obecné porozumění procesu, kdy se diferencující se buňky organizují v trojrozměrném prostoru.

Ptačí embrya (embryo kuřete, křepelky) byla a stále jsou tradičně používaným

modelovým organismem pro svou dobrou přístupnost k experimentálním zásahům. S rozvojem molekulárně genetických metod se v posledních letech více a více prosazují modely savců, jako je myš či potkan.

Srovnávací anatomie používá termíny hrudní a pánevní končetina, které jsou univerzálně použitelné u všech obratlovců se čtyřmi končetinami tedy např. i u ptáků. Vzhledem k tomu, že jsme pracovali s potkanem a myší, v této práci používáme termíny přední a zadní končetina, které by neměly vést k nedorozumnění.

Při studiu vývoje končetiny lze buď experimentálně působit na fyziologické (wild type) jedince, či hledat odlišnosti ve vývoji jedinců nesoucí spontánně či cíleně vzniklou mutaci s fenotypickým projevem na končetině. Druhý z těchto možných přístupů jsme zvolili my, když jsme využili dvou spontánně vzniklých kmenů potkanů s odlišným počtem prstů, jednoho s polydaktylií, druhého s oligodaktylií a také myši s cíleně vyřazeným genem (knock out).

Tato disertační práce je založená na několika originálních publikacích, které se tomuto tématu věnují, jedna publikace je v přípravě.

### 3. Přehled problematiky dizertační práce

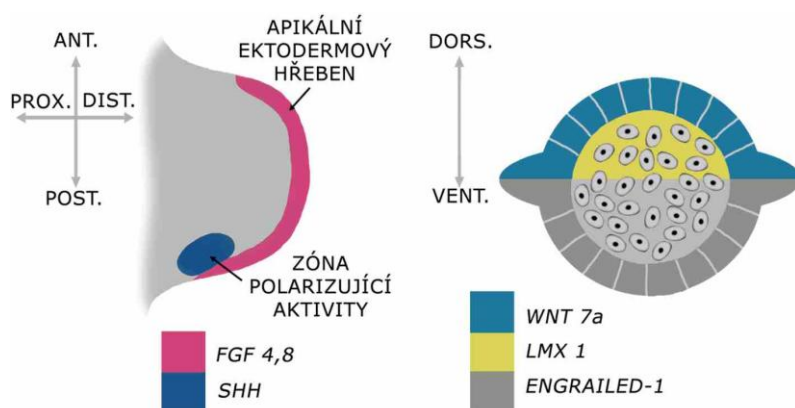
Tato kapitola nabízí úvod do problematiky vývoje a vrozených vad končetin. Popisuje geny a genové rodiny, které jsou pro vývoj končetiny důležité a s kterými jsme pracovali.

#### 3.1. Genová regulace embryonálního vývoje končetin

##### 3.1.1 Vývoj základních os končetiny v trojrozměrném prostoru

Končetina všech čtyřnožců včetně člověka se skládá ze třech základních částí: z proximálního stylopodia, středního zeugopodia a distálního autopodia.

Vývoj končetiny lze zhruba rozdělit do třech fází: indukce končetinového pupenu, časný vývoj pupenu a pozdní morfogeneze končetiny. Po první fázi, kdy je indukován vznik končetinového pupenu, pokračuje růst pod kontrolou signálních center a vytvářejí se tři osy budoucí končetiny: proximodistální, palcomalíková (v srovnávací embryologické literatuře bývá označováno jako anteroposteriorní) a dorsoventrální, obr.1. V pozdní fázi morfogeneze se vytvářejí kosti, svaly se šlachami, cévy, nervy a další struktury končetiny.



Obr. 1. Genová regulace základních os vyvíjející se končetiny. Apikální ektodermový hřeben produkuje faktory z rodiny FGF, klíčové pro proximodistální růst končetiny. Anteroposteriorní osa je kontrolována buňkami zóny polarizující aktivity produkujícími Shh. Dorsoventrální osa je iniciována expresí *Wnt7a* v dorzálním ektodermu, který vzápětí indukuje expresi *Lmx1* v dorzálním mezenchymu končetinového pupenu. Ventrální ektoderm exprimuje *Engrailed-1*.

(Převzato z Šnajdr et al. 2010)

Základ končetiny, končetinový pupen, se začíná vyvíjet u kuřete 3.den, u myši 10. den, u potkana 12.den, u člověka koncem 4. týdne po oplození. Epitel na povrchu pupenu vytváří na jeho konci na rozhraní ventrální a dorsální části končetiny tzv. apikální ektodermový hřeben (AER, apical ectodermal ridge) produkující růstové faktory z

rodiny Fgf (více o Fgf viz kapitola 3.1.4). Ty udržují subektodermální zónu pupenu, zhruba 300 mikrometrů širokou vrstvu mesenchymu, tzv. zónu progresu (progress zone), v proliferační aktivitě. Experimentální odstranění AER vede k zástavě proliferace mesenchymu a chybění distální části končetiny (Saunders, 1948; Summerbell, 1974). Čím dříve pak během vývoje k odstranění AER dojde, tím větší část končetiny chybí. Tyto a další experimenty vedly k ustanovení modelu proximo-distálního vývoje končetiny, k tzv. progress zone modelu (Summerbell et al., 1973). Ten předpokládá, že k proximo-distální specifikaci dochází postupně, podle toho jak dlouhý čas strávily buňky v nediferencovaném stavu v zóně progresu pod vlivem AER. Čím delší dobu buňky v této zóně strávily, tím distálnější struktury končetiny vytvářejí. Jiný, nověji navržený model (Dudley et al., 2002), předpokládá již velmi časnou specifikaci všech základních částí končetiny jako odlišných domén (early specification model), které se pak dále vyvíjejí a diferencují. Nedávno byl navržen ještě třetí model, tzv. dvousignálový, vycházející z představy, že primárně jsou specifikovány proximální a distální segment končetiny, třetí, prostřední segment pak vzniká interakcí buněk na rozhraní proximálního a distálního segmentu (Mariani et al., 2008). Mezi příznivci těchto teorií se vedou v současnosti debaty, která z nich nejlépe objasňuje experimentálně získaná data (Niswander, 2003; Towers and Tickle, 2009).

Anteroposteriorní (palcomalíkové) uspořádání základu končetiny je řízeno buňkami při basi zadního okraje končetinového pupenu, z tzv. zóny polarizující aktivity, ZPA (zone of polarizing activity), produkující faktor Shh (více o Shh viz kapitola 3.1.3).

Pro dorsoventrální osu končetiny je klíčová rozdílná exprese genů *Wnt7a* a *Lmx1* v dorzální části, respektive *Engrailed-1* ve ventrální části končetinového pupenu.

Tvarové změny vyvíjející se končetiny jsou podmíněny lokálně rozdílnou proliferační aktivitou a odumíráním buněk. Zvláště při vývoji autopodia při tvorbě prstů se vznikem meziprstních štěrbin se uplatňuje apoptóza. Apoptóza proběhne v nedostatečném rozsahu u syndaktylie, rozsah apoptózy je změněn také při polydaktylii či oligodaktylii.

Vývoj horní a dolní končetiny je podobný (Hinrichsen et al., 1994), dolní končetina je u člověka ve vývoji o 1-2 dny zpožděna. Geny zodpovědné za identitu horní a dolní končetiny jsou *Tbx5* instruující vývoj horní končetiny a *Pitx1* a *Tbx4* řídící vývoj dolní končetiny.

Z mesenchymu základu končetiny se diferencují buňky všech typů pojiva. Další buněčné populace do končetin migrují z axiálních struktur embrya. Základ končetiny je tak osidlován myogenními buňkami ze somitů, jejichž migrace je řízena interakcí

signálů Pax-3, HGH/SF, c-met. Např. mutace genu *Pax-3* u myši způsobuje specificky redukci svalů končetin, zatímco svaly hlavy a trupu se vyvíjejí normálně (Franz et al., 1993). Krevní cévy končetiny vznikají převážně prorůstáním intersomitických cév, v menší míře z angioblastů, které se rekrutují a diferencují *in situ* z materiálu končetiny (Brand-Saberi et al., 1995). Do končetiny vrůstají dále z míchy axony motoneuronů a migrují do ní buňky neurální lišty, z kterých vznikají Schwanovy buňky, melanocyty a Merkelovy buňky (Szeder et al., 2003)

### 3.1.2 *Hox* geny

*Hox* geny obsahují vysoce konzervovaný, 180 bp dlouhý úsek zvaný homeobox, kódující tzv. homeodoménu zodpovědnou za rozpoznávání a interakci s regulačními sekvencemi DNA. U obratlovců jsou *Hox* geny exprimovány již časně v průběhu gastrulace a definují identitu segmentů podél kraniokaudální osy těla. V pozdějších etapách vývoje řídí tyto geny kromě růstu končetin také např. vývoj urogenitálního systému, trávicí trubice, plic a jsou důležité pro krvetvorbu.

Všichni savci mají čtyři komplexy *Hox* genů, *Hox A-D* na čtyřech různých chromozomech, dohromady 39 *Hox* genů uspořádaných do 13 paralogních skupin.

Exprese *Hox* genů určující kraniokaudální osu tělní je klíčová i pro stanovení pozice končetinového pole, tedy oblasti v mesodermu laterální ploténky z které se vyvíjejí budoucí končetiny. Např. vyřazení genu *Hoxb5* u myši způsobí kraniální posun umístění přední končetiny (Rancourt et al., 1995). Změněná exprese *Hox* genů je zodpovědná za absenci/redukci končetin u hadů i prodloužení jejich axiálního skeletu (Cohn and Tickle, 1999).

Pro vývoj vlastní končetiny jsou klíčové geny ze skupin *HoxA* a *HoxD*. (Zakany and Duboule, 2007). *Hoxa9-13* definují proximodistální, *Hoxd9-13* pak anteroposteriorní osu končetiny. Jejich exprese probíhá ve dvou vlnách, každá vlna je řízena transkripčně nezávisle. První vlna exprese určuje vývoj končetiny zhruba do úrovně karpu/tarsu (tedy vývoj stylopodia a zeugopodia). Druhá vlna exprese je nutná pro vývoj nejdálší části končetiny, autopodia (ruky/nohy). Geny jsou exprimovány v sekvenci odpovídající místní i časové kolinearitě typické pro *Hox* rodinu. Geny skupiny 9 jsou exprimovány homogeně již v časném končetinovém pupenu, postupně s růstem končetinového pupenu nastupuje exprese skupin 10,11, exprese skupiny 12 a 13 je pak omezena na distální část vyvíjející se končetiny. Na rozdíl od situace na trupu

nezpůsobuje vyřazení Hox genu na končetině klasickou homeotickou transformací, ale redukci toho segmentu končetiny, v kterém je za vývoje gen exprimován.

U člověka byly v souvislosti s postižením končetin popsány mutace v genech *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXD10* a *HOXD13*. Nejčastější z těchto onemocnění jsou syndrom hand-foot-genital podmíněný mutací genu *HOXA13* s postižením autopodií s typickou hypoplasíí palců spolu s postižením genitálu (Mortlock and Innis, 1997) a synpolydaktylie podmíněná mutací genu *HOXD13* (Goodman et al., 1997).

### 3.1.3 *Shh*

*Shh*, sonic hedgehog, je jeden ze tří homologních genů hedgehog rodiny u savců (spolu s desert hedgehog a Indian hedgehog). *Shh* se podílí na regulaci vývoje mnoha tělních systémů a orgánů (např. CNS, zuby, cévy) a je také klíčovou signální molekulou při vývoji distální části končetin, zvláště autopodia. Jeho receptorem je Patched (Ptc), tvořící komplex se Smoothened (SMO), dalším klíčovým proteinem *Shh* signalizační kaskády.

Exprese *Shh* v končetině je omezena do oblasti zadní hrany vyvíjející se končetiny, do organizačního centra zvaného zóna polarizující aktivity (ZPA). Klasické transplantací experimenty, kdy je ZPA transplantováno na přední (palcovou) část pupenu příjemce vede k zrcadlovému zdvojení autopodia. Tento efekt je vyvolán i při mezidruhově transplantaci, např. přenosem ZPA myši na kuře. Stejný efekt jako transplantace ZPA má aplikace kyseliny retinové, shrnutí těchto pionýrských experimentů viz (Tickle, 2004). V roce 1993 bylo prokázáno, že polarizující efekt ZPA je zprostředkován produkcí *Shh* (Riddle et al., 1993). Experimentální delece *Shh* u myši (Chiang et al., 2001) vede, kromě defektů dalších systémů, též k vývoji distálně redukovaných končetin, s vytvořeným jedním prstem - palcem. Tyto i další experimenty, mapující osud buněk původem ze ZPA a jejich podíl na vzniku prstů, modifikovaly naši dnešní představě o funkci *Shh* jako morfogenu. Ukazuje se, že svou roli hraje nejen koncentrace, ale (hlavně) také doba po kterou je tkáň účinku *Shh* vystavena (Harfe et al., 2004). Prsty 3,4,5 jsou definovány spíše dobou, po kterou jsou vystaveny účinku konstantní koncentrace *Shh* v ZPA, prst číslo 2 je definován poklesem koncentrace *Shh* a nejlépe tak odpovídá modelu morfogenetického pole, prst 1 je na účinku *Shh* nezávislý.

Pro zprostředkování/regulaci funkce *Shh* je klíčový jeho protihráč *Gli3*, exprimovaný v přední části končetinového pupenu. Delece *Gli3* způsobuje polydaktylii s 6-8 vzájemně



velmi podobnými prsty u jinak relativně dobře vyvinuté končetiny (Hui and Joyner, 1993). Dvojitá delece *Shh*<sup>-/-</sup> *Gli 3*<sup>-/-</sup> pak způsobuje velmi podobný fenotyp, polydaktylii se 6-8 prsty, s opět morfologicky vzájemně velmi podobnými prsty (Litingtung et al., 2002). Zeugopodium je u této dvojité delece skoro normální v porovnání se *Shh*<sup>-/-</sup>. Právě výsledky této poslední práce nás znovu nutí promýšlet funkci Shh. Zdá se, že spolu s Gli3 spíše omezují počet prstů autopodia a definují jejich identitu, jakoby autopodium bylo standardně, předvoleně nastaveno na vývoj více než 5 prstů.

Vzhledem ke klíčové roli Shh v ZPA a jejímu vlivu na vývoj počtu a identitu prstů, klasifikují někteří autoři polydaktylie na typ 1, na Shh závislé, u kterých dochází k ektopické aktivaci *Shh* a na typ 2, na Shh nezávislé, kdy je exprese *Shh* v normálním rozsahu (Talamillo et al., 2005). Obdobně u některých typů oligodaktylie je rozsah exprese *Shh* zmenšen (Chan et al., 1995).

U člověka je *SHH* jeden z genů, jehož mutace způsobuje holoprosencefalii, postižení vývoje koncového mozku a obličeje. Mutace ZPA regulační sekvence (ZRS) ve vzdálenosti 1Mb od genu *SHH* způsobuje preaxiální polydaktylii (Lettice et al., 2003). Zdá se, že tato mutace by mohla být u malformací končetin relativně častá (Furniss et al., 2009).

Mutace genu *GLI3* způsobuje u člověka syndromy, jejichž součástí bývá též postaxiální polydaktylie, či polysyndaktylie např. Greigův kefalopolysyndaktylní syndrom (Pettigrew et al., 1991), syndrom Pallister-Hallové (Kang et al., 1997). Mutace *GLI3* jsou popsány i u izolovaných polydaktylií pre i postaxiálních (Radhakrishna et al., 1999).

### 3.1.4 *Fgf* geny

*Fgf*, fibroblast growth factor, je poměrně velkou rodinou genů. V současnosti je u člověka i u myši popsáno 22 jejích členů. Fgf interagují s příslušnými receptory Fgfr. Do rodiny Fgfr receptorů patří Fgfr1 - Fgfr4, některé ve více alternativních sestřizích. Je tedy řada typů Fgfr, některé jsou tkáňově specifické. Obvykle se na každý z receptorů může vázat několik různých Fgf proteinů, a naopak každý z Fgf proteinů se může vázat na více různých typů Fgfr.

Zjednodušeně můžeme říci, že pro vývoj končetiny jsou klíčové *Fgf 4, 8, 10*. Vedle nich jsou však v končetině exprimovány a mají specifické funkce i mnohé další geny této rodiny.

Pro indukci základu končetiny je zásadní exprese *Fgf 8* a *Fgf10* mezodermem laterální ploténky v místě budoucí končetiny (Tickle and Munsterberg, 2001). Pokud je kdekoliv do oblasti mezi budoucí horní a dolní končetinou vložena kulička uvolňující (nebo peleta buněk produkující) *Fgf 8* (Crossley et al., 1996) nebo *Fgf10* (Ohuchi et al., 1997), ale i *Fgf 1, 2 a 4* (Ohuchi and Noji, 1999), v tom místě se indukuje vznik třetího (nadpočetného) končetinového pupenu, jehož vývoj pokračuje až do vzniku více či méně normální končetiny.

Pod vlivem *Fgf 7,10* se tvoří AER (Yonei-Tamura et al., 1999), AER pak produkuje faktory *Fgf 4, 8, 9 a 17*. Ty jsou pro AER specifické, mimo něj nejsou v končetině produkovány a mají v AER základní funkci jako stimulatory proliferace mesenchymu končetiny kontrolující aktivitu buněk v zóně progresu. Experimentální delece genu *Fgf8* v AER vede jako u jediného z této skupiny k postižení vývoje končetiny (Lewandoski et al., 2000), vyřazení *Fgf 4,9*, nebo *17* nemá na vývoj končetiny negativní vliv. Funkce vyřazeného genu je pravděpodobně nahrazena redundantní funkcí jiného člena rodiny. Expres *Fgf8* také nejlépe koresponduje se vznikem, rozsahem i regresí AER a je proto považována za její marker. Ostatní geny (*Fgf 4,9,17*) jsou v AER exprimovány v menším rozsahu, pouze v zadních 2/3 až 1/2 AER. Jednotlivé proteiny *Fgf* jsou schopny nahradit funkci AER po jeho experimentálním chirurgickém odstranění (Martin, 1998).

Produkce *Fgf* je udržována vlivem *Shh*, naopak *Fgf* zpětnou vazbou udržují expresi *Shh* v ZPA.

U člověka je dnes známo nejméně 15 syndromů a onemocnění (Coumoul and Deng, 2003) způsobených mutacemi FGFR, typicky s generalizovaným postižením skeletu vedoucím ke zkrácení tělesné výšky a malformacím končetin, typická také bývá kraniosynostóza.

### 3.1.5 *Bmp* geny

*Bmp*, bone morphogenetic protein, je skupina růstových faktorů (v současnosti je popsáno kolem 20 jejích členů) patřící do širší rodiny transformačních růstových faktorů beta (TGF Beta – transforming growth factor beta). Interagují se svými receptory *Bmpr1a*, *Bmpr1b* a *Bmpr2*. Pro vývoj končetiny jsou zvláště klíčové geny *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* (Geetha-Loganathan et al., 2006). Jejich role je důležitá pro vznik i regresí AER, indukci a diferenciaci chrupavky i kosti. Ovlivňují tvorbu prstů regulací apoptózy mezi paprsky budoucích prstů (Bandyopadhyay et al., 2006; Zuzarte-Luis and Hurle, 2005). Před začátkem apoptózy jsou všechny tyto tři geny *Bmp 2,4,7* zvýšeně

exprimovány v mesenchymu budoucích meziprstních štěrbin, inhibice BMP signalizace (např. blokátorem noggin) v těchto místech naopak apoptózu inhibuje. Není však zřejmé, zda BMP kaskáda má přímý vliv na apoptózu, nebo zda se jedná o vliv zprostředkovaný regulací Fgf proteinů, fungujících jako faktory regulující přežití buněk (Pajni-Underwood et al., 2007). Efekt BMP signalizace je závislý na kontextu, aplikace kuliček uvolňujících Bmp do nediferencovaného meziprstního mesenchymu indukuje apoptózu, aplikace do blízkosti již diferencujícího se chrupavčitého základu paprsku prstů indukuje chondrogenezu a vznik nadpočetného prstu (Macias et al., 1999).

Delece receptoru *Bmpr1a* u myši (Yoon et al., 2005) způsobuje chondrodysplázii se zkrácením kostí a zpomalenou osifikací, delece *Bmpr1b* (Yi et al., 2000) způsobuje defekt falangů a kloubů končetin. Dvojitá delece *Bmpr1a*<sup>-/-</sup> *Bmpr1b*<sup>-/-</sup> způsobuje těžkou generalizovanou chondrodysplazii (Yoon et al., 2005).

U člověka mutace *BMP4* způsobují anomálie vývoje i počtu prstů spolu s poruchami vývoje mozku, očí (mikroftalmie), často i rozštěpové vady (Bakrania et al., 2008).

Mutace *BMPR1B* je u člověka zodpovědná za brachydaktylii typu A2 (Lehmann et al., 2003)

### 3.1.6 Sox geny

Rodina Sox transkripčních genů (Sox = Sry-related HMG box) je definována homologií DNA vázající HMG (high mobility group) domény popsané původně u SRY genu na chromozomu Y. U savců je zatím popsáno 20 členů této rodiny. Vedle determinace pohlaví či vývoje CNS jsou některé Sox geny klíčové v průběhu chondrogeneze. Vedle nejdůležitějšího z nich, genu *Sox 9* (označovaný jako „master gene of chondrogenesis“) jsou to hlavně s ním kooperující *Sox 5* a *Sox 6* (Lefebvre et al., 1998)

Exprese *Sox9* se objevuje již v časně fázi kondenzace mezenchymu a pokračuje v celém průběhu chondrogeneze (Healy et al., 1996). Myš s deletovanou 1 alelou tohoto genu (*Sox9* +/-) umírá v perinálním období, dominantním postižením je hypoplasie chrupavky a rozštěp patra (Bi et al., 2001).

Delece obou alel *Sox 9* je již velmi časně letální, indukibilní delece tohoto genu v pozdějších stádiích vývoje ukazují jeho klíčovou roli pro kondenzaci mesenchymu i následnou chondrogenezi (Akiyama et al., 2002; Akiyama et al., 2004). Inaktivace *Sox9* v mesenchymových buňkách končetiny ještě před začátkem kondenzace vede k vývoji krátkých končetin zcela bez skeletu. Inaktivace *Sox9* až po kondenzaci mesenchymu

vede k těžké chondrodysplasii, kdy většina kondenzovaných buněk se dále nediferencuje do chondrocytů. Sox 9 je také důležitým faktorem podporujícím proliferaci chondrocytů. Jeho inhibice je důležitá pro ukončení proliferace a přechod chondrocytů do prehypertrofické fáze svého vývoje.

Sox9 přímo indukuje expresi *Col2a1*, molekulárního markeru proliferujících chondrocytů (Bell et al., 1997) i dalších genů, jejichž proteiny jsou typické pro mezibuněčnou hmotu chrupavky (*Col9a1*, aggrecan).

Exprese Sox9 je regulována prostřednictvím BMP signalizace. Dvojitá delece *Bmpr1a* a *Bmpr1b* u myši vede k těžké generalizované chondrodysplasii kdy Sox9 není vůbec exprimován (Yoon et al., 2005).

Při indukci ektopické chondrogenese pomocí kuličky uvolňující Bmp se objevuje v místě kuličky exprese Sox9 již velmi časně, po 30 minutách (Chimal-Monroy et al., 2003).

Mutace *SOX9* u člověka způsobuje kampomelickou dysplázií, s typickým postižením dlouhých kostí končetin, u mužů také s postižením vývoje genitálu (Foster, 1996).

### 3.1.7 *Plzf*

*Plzf*, promyelocytic leukemia zinc finger, známý též jako *Zbtb16* či *Zfp145*, je gen kódující transkripční faktor popsáný původně v souvislosti se vznikem leukemie, odtud jeho název.

Experimentální delece tohoto genu u myši *Plzf* <sup>-/-</sup> (Barna et al., 2000) vede k homeotickým transformacím axiálního skeletu a preaxiální polydaktylii. Kromě toho jsou *Plzf* <sup>-/-</sup> samci neplodní, kvůli nedostatečné schopnosti sebeobnovy kmenových buněk spermatogeneze (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004).

Studie Buaase a kol. také ukázala (Buaas et al., 2004), že klasická spontánní myší mutace *luxoid* (*lu*) je způsobena nonsense bodovou mutací *Plzf*.

Během vývoje *Plzf* moduluje expresi *Hoxd10-13* v končetině. Funguje jako transkripční represor exprese těchto *Hox* genů v přední (palcové) části autopodia. Tato represe je zprostředkována přímou interakcí *Plzf* proteinu se specifickou sekvencí *Hox* klastru a aktivací Polycomb represorových proteinů (Barna et al., 2002).

Dvojité vyřazení genů *Plzf* <sup>-/-</sup> *Gli3* <sup>-/-</sup> (Barna et al., 2005) vede k defektu ve vývoji stylopodia a zeugopodia, autopodium je překvapivě relativně dobře vyvinuto.

Kromě kontroly vývoje končetin a spermatogeneze se Plzf dále podílí na regulaci apoptózy, buněčného cyklu, krvetvorby a vzniku nádorů krevních řad, ovlivňuje regulaci krevního tlaku.

U člověka byla publikovaná studie klinického případu (Fischer et al., 2008) popisující pacienta s bodovou mutací *PLZF* na mateřském chromozómu a s 8Mb delecí otcovského chromozómu 11q23, kdy došlo ke ztrátě mimojiné genu *PLZF*. Kromě symptomů typických pro delecí 11q23 se u tohoto pacienta manifestovala také absence palců, hypoplasie radia a ulny, nadpočetné obratle a žebra, zpomalená maturace kostry a hypoplasie genitálu.

### **3.1.8 *Cntrob* (*Lip8*, *NIP2*)**

Byl identifikován jako interagující protein při yeast two-hybridisation jako LYST (lysozomyl trafficking regulator) interacting protein 8, odtud název Lip8 (Tchernev et al., 2002). Jiným týmem byl popsán (Zou et al., 2005) jako gen interagující s BRCA 2 a pojmenován *Cntrob* (jeho protein pak centrobín) vzhledem ke své s centriolem spojené lokalizaci a funkci. Dvojice centriolů, jako základní komponenta centrosómu, se při buněčném dělení duplikuje. *Cntrob* je při tomto rozdělení asymetricky lokalizována do dceřinného centriolu. Vyřazení *Cntrob* užitím RNAi inhibuje duplikaci centriolu a vede ke vzniku centrosómu s jedním nebo se žádným centriolem a k poruchám buněčného dělení. V jedné z dalších prací (Jeong et al., 2007) byl *Cntrob* nazván *NIP2*, což je zkratkou Nek2- interacting protein, pro svou interakci s mitotickou kinásou Nek2, důležitou pro organizaci centrosómu a stabilitu mikrotubulů.

Žádné údaje o roli tohoto genu pro vývoj končetiny či spermatogenezi nebyly publikovány.

### **3.1.9 *c-myb***

Protoonkogen *c-myb* (*MYB*) je nejdéle známým členem rodiny Myb transkripčních faktorů. Je znám již od 70.let, kdy byla identifikována jeho zkrácená onkogenní varianta *v-myb*, jako součást genomu dvou retrovirů způsobujících u kuřat myeloblastózů, monocytární leukemii (od termínu myeloblastosis je také odvozen akronym myb).

*c-Myb* je transkripční faktor skládající se ze tří funkčních domén: DNA vazebná doména na N konci, centrální transaktivační doména a negativní regulační doména blíže C konci (Oh and Reddy, 1999). Pro funkci negativní transaktivační domény se zdá klíčový motif leucinového zipu zodpovědný za jeho dimerizaci, v případě *v-myb* za

schopnost indukce leukemie (Bartunek et al., 1997) či schopnost diferenciaci nezralých buněk do určitých buněčných typů (Karafiat et al., 2001).

Nejintenzivněji byla zkoumána role *c-myb* v krvetvorbě. Studie hematopoietických buněk ukazují, že *c-myb* je exprimován v nezralých, progenitorových buňkách erytroidní, myeloidní i lymfoidní řady a jeho exprese klesá s jejich diferenciací. Experimentálně navozená exprese *c-myb* brání terminální diferenciaci erythroidní a myeloidní řady (Yanagisawa et al., 1991). Blokáda *c-myb* pomocí antisense oligonukleotidů narušuje proliferaci i diferenciaci těchto krevních řad (Gewirtz and Calabretta, 1988). Tento obecný princip, kdy *c-myb* je exprimován v nezralých, dělících se buňkách a s jejich diferenciací exprese *c-myb* klesá, platí i u dalších tkání, ve kterých je tento gen exprimován. Exprese *c-myb* genu v embryonálním vývoji byla, na základě ISH prováděných na řezech, prokázána u myši od 10. embryonálního dne v játrech, od 12. dne a později v thymu, štítné žláze, epitelu střeva, bronchiálním epitelu, v CNS, oku a několika dalších tkáních (Sitzmann et al., 1995). Postnatálně je *c-myb* exprese patrná v játrech, střevních kryptách, v CNS.

Experimentální vyřazení genu *c-myb* (Mucenski et al., 1991) vede k odumírání embryí v průběhu 15. embryonálního dne z důvodu těžké anemie, kdy nedochází ke správnému přechodu extraembryonální na intraembryonální krvetvorbu.

Vzhledem k časné letalitě *c-myb*<sup>-/-</sup> nebylo možné posoudit vliv tohoto genu na pozdější vývoj ostatních tělních systémů. Selektivní vyřazení *c-myb* genu u myši pouze v části tlustého střeva (Malaterre et al., 2007) vede k poškození homeostázy střevních krypt. Selektivní vyřazení *c-myb* v nervové tkáni vede k absenci buněk v subventrikulární zóně mozku (Malaterre et al., 2008). Tyto práce dokumentují roli tohoto genu pro regeneraci kontinuálně se obnovující populace buněk.

V naší práci zabývající se rolí *c-myb* genu u kuřete jsme popsali spíše ubikvitní expresi *c-myb* ve většině tkání kuřete (Karafiat et al., 2005). Exprese *c-myb* u kuřete se tak mnohem více podobá expresi tohoto genu u drápatky (Amaravadi and King, 1994), než u myši. Výsledky této práce ukázaly, že jedna z rolí c-Myb u kuřete je regulace epitelomesenchymového přechodu při vzniku neurální lišty a že *c-myb* je v nervové trubici down stream genem signalizace Bmp4 a spouští expresi dalších genů této kaskády, genů *msx1* a *slug*. Bylo prokázáno že: a) Bmp4 aktivuje expresi *c-myb*; b) exprese *c-myb* aktivuje expresi *msx1* a *slug* jejichž exprese je spouštěna také Bmp4; c) pokud je exprese *c-myb* v nervové trubici experimentálně zablokována, aplikace Bmp4 nespouští expresi genů *msx1* a *slug*.

### **3.2. Polydaktylie, hypodaktylie**

**Polydaktylie**, přítomnost nadpočetného prstu. Je-li nadpočetný prst na palcové (radiální) straně, jedná se preaxiální polydaktylii (a nadpočetný prst se nazývá prepollex/prehallux), je-li umístěn na malíkové (ulnární) straně jedná se o postaxiální polydaktylii (a nadpočetný prst se nazývá postminimus). Vzácně se nadpočetný prst objevuje mezi středními třemi prsty, jedná se pak o centrální polydaktylii.

Polydaktylie je u člověka relativně častá, incidence se udává mezi 1-13 případy na 1000 porodů a výrazně se odlišuje mezi rasami (Finley et al., 1994). V České republice bylo v roce 2008 podle údajů Národního registru vrozených vad České republiky zaznamenáno 154 případů polydaktylie.

**Hypodaktylie, oligodaktylie**, chybění jednoho nebo více prstů. Je mnohem vzácnější než polydaktylie, vyskytuje se jako součást syndromů i izolovaně, o její incidenci u člověka nejsou žádné údaje.

### **3.3. Geneticky podmíněné vady končetin u člověka**

Vrozené vady končetin jsou vedle vad srdce a močového systému jedněmi z nejčastějších vrozených vad. Objevují se samostatně i jako součásti syndromů a tvoří zhruba 10% ze všech vrozených vad (Kozin, 2003).

Zhruba polovina vrozených malformací končetiny u člověka se manifestuje oboustranně, postižení jen jedné strany je zhruba stejně časté na pravé či levé straně (Furniss et al., 2009).

Podle údajů Národního registru vrozených vad České republiky - ÚZIS ČR bylo v naší republice v roce 2008 nově zaznamenáno 154 případů polydaktylie, 142 případů syndaktylie a 41 případů redukčních defektů končetin.

Příčiny vzniku vrozených vad se tradičně dělí na genetické a epigenetické (zevní). Předpokládá se, že čistě genetické faktory se uplatňují při vzniku asi 20% vrozených vad, izolované zevní faktory asi v 10%, u zbývajících 70% vad není jednoznačná příčina známa a jedná se patrně o kombinaci genetických a epigenetických faktorů.

Roztřídění a nomenklatura vrozených vad končetin prochází neustálými úpravami a různí autoři navrhuji neustále nové klasifikace či modifikují ty stávající. Vzhledem k rozdílnosti a zatím jen částečné znalosti etiologie (genetické, negenetické faktory) i kombinaci různých typů postižení u jednoho jedince, nelze ani vytvoření jasné a přesné klasifikace očekávat.

Jedna z nejužívanějších klasifikací, doporučována i WHO, je Swansonova klasifikace z roku 1976, (Swanson, 1976) snažící se postihnout hlavní typický znak postižení.

Vrozené vady končetin dělí tato klasifikace do 7 skupin.

1. chybný vývoj (ve smyslu chybného založení a formace části končetiny)

např. fokomelie, tedy chybění paže a předloktí, kdy na pletenec nasedá přímo relativně normálně vyvinutá ruka (na dolní končetině obdobně)

2. chybná diferenciacce a separace

např. synostózy, syndaktylie

3. zdvojení

např. polydaktylie, trifalangeální palec

4. nadměrný růst (hypertrofie, gigantismus)

např. makrodaktylie

5. nedostatečný růst (hypoplazie)

6. vrozená konstrikce způsobená amniotickými pruhy

7. generalizované skeletální vady

Jiné klasifikace dělí defekty končetin ryze podle jejich anatomického umístění, tedy na příčné (transverzální) a podélné (longitudinální). Ty pak je možno dále specifikovat jako koncové (terminální) či vmezežené (interkalární).

S rozvojem genetické diagnostiky roste naše znalost genů zodpovědných za některé tyto vady. Jejich detailnější rozbor není tématem této práce, některé, alespoň ty nejzajímavější pro srovnání s údaji získanými na experimentálních modelech, byly uvedeny u popisu jednotlivých genových rodin.



## 4. Cíle práce

### 4.1. Vývoj končetiny u polydaktylního *Lx* potkana a u oligodaktylního *Hd* potkana

Cílem studia bylo zjistit jak se vývoj končetiny těchto kmenů odlišuje od fyziologického vývoje normodaktylního potkana. Stanovili jsme si následující otázky:

1. Mutace jakého genu je zodpovědná za příslušný fenotyp? Jaký je konkrétní charakter této mutace?
2. Je změněna exprese genu zodpovědného za fenotyp? Pokud ano jakým způsobem?
3. Je změněna exprese jiných, pro vývoj končetiny klíčových genů?
4. Jaká je funkce genu jehož mutace je zodpovědná za příslušný fenotyp?
5. Jsou postiženy i další orgánové systémy? Pokud ano, hrají v něm roli podobné molekulární mechanismy jako u vývoje končetin?

### 4.2. Role *c-myb* při vývoji končetiny myši

Byly stanoveny tyto otázky:

1. Je exprese *c-myb* v končetině myši přítomna? Pokud ano, v jakých vývojových stadiích a v jakých tkáních končetiny je *c-myb* exprimován?
2. Je fenotyp končetin u jedince s vyřazeným genem *c-myb* (*c-myb*<sup>-/-</sup>) jiný než u kontrolního WT jedince? Pokud ano, můžeme předpokládat, že za tento fenotypový rozdíl by bylo zodpovědné právě vyřazení tohoto genu.

## 5. Modelové organismy a vybrané metody

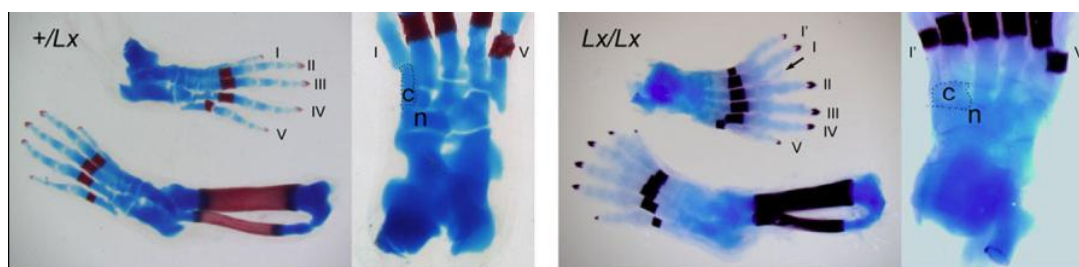
Všechny experimenty byly prováděny v souladu s §11 vyhlášky č.207/2004 Sb. , o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty I.LF UK.

### 5.1. Modelové organismy

#### 5.1.1 *Lx* polydaktylní potkan, kmen PD5.

Alela *Lx* byla popsána na začátku 70.let jako spontánní mutace outbredního kmene Wistar (Kren, 1975). Potkan nesoucí mutaci se stal zakladatelem inbredního kmene PD/Cub. *Lx* byl později přenesen na genetická pozadí kmenů SHR (spontaneously hypertensive rat) a BN (Brown Norway), vznikly tak kmeny SHR.*Lx*.PD5 (dále jen PD5) a BN.*Lx*. Je zajímavé, že genetické pozadí má zásadní vliv na fenotyp *Lx* mutace (na expresivitu a penetranci *Lx* alely). U BN.*Lx* se projevuje jako semidominantní a postiženy jsou přední i zadní končetiny. U PD5 se projevuje striktně jako recesivní mutace, postižení se objevuje pouze na zadních končetinách. V naší studii jsme použili pouze kmen PD5.

Pro PD5 homozygoty (*Lx/Lx*) je typická preaxiální polydaktylie zadních končetin vedoucí k přítomnosti šesti trifalangeálních prstů, u většiny případů je také vytvořen rudiment prstu mezi prsty I a II, obr. 2. To je doprovázeno změnou tvaru kostí tarzu, jejich počet se však nemění. Zeugopodium a stylopodium jsou utvořeny normálně. Přední končetiny nejsou postiženy. Osový skelet není postižen. *Lx* heterozygoti (+/*Lx*) jsou fenotypicky nerozlišitelní od WT kontrol (+/+).

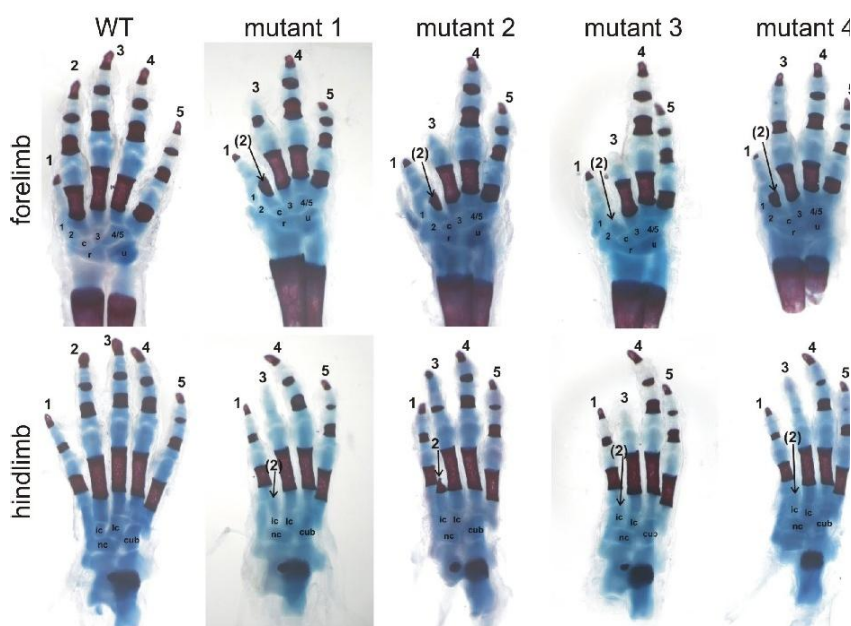


Obr. 2. Fenotyp zadních končetin *Lx* potkana (Převzato z Liška, Šnajdr et al. 2009).

### 5.1.2 *hd* hypodaktylní potkan, kmen WHD (Wistar hypodactylous)

*hd* mutace byla popsána v 70.letech (Moutier et al., 1973) jako spontánně vzniklá recesivní mutace.

Pro *hd/hd* homozygoty je typická ztráta či redukce prstů II a III na přední i zadní končetině, obr 3. Stylopodia a zeugopodia *hd/hd* odpovídají WT kontrolám. Kosti karpu/tarsu i prstové paprsky prstů I, IV a V také odpovídají WT. Prst II obvykle chybí s redukovaným či rudimentárním metakarpem/metatarsem. Postižení prstu III je velmi variabilní. Většinou je zkrácen nebo malformován, někdy chybí, metakarp/metatars je obvykle normální. Zkrácený prst III má navíc redukovaná osifikační centra ve středním a distálním falangu.



Obr. 3. Fenotyp končetin *hd* potkana. WT kontrola vlevo srovnána se 4 různými *hd* fenotypy. (Převzato z Liška et al. 2010).

Pro samce *hd/hd* je dále typická infertilita, kdy v nadvarleti spermie zcela chybějí. Vzhledem k infertilitě *hd/hd* samců je chov udržován křížením *hd/hd* samic a plodných *+/hd* samců.

*hd* heterozygoti (*+/hd*) jsou fenotypicky nerozlišitelní od WT kontrol (*+/+*)

### 5.1.3 *c-myb* <sup>-/-</sup> myš

Vyřazení genu bylo vytvořeno inzercí neo boxu do šestého exonu genu *c-myb* (Mucenski et al., 1991). Vývoj *c-myb* <sup>-/-</sup> embryí probíhá do 13. embryonálního dne normálně, odpovídá WT kontrole. V průběhu 15. embryonálního dne však *c-myb* <sup>-/-</sup> embrya umírají s obrazem těžké anemie, kdy jejich hematokrit je desetkrát nižší než u WT kontrol. Je známo, že u myši probíhá během 12-13. embryonálního dne přechod z extraembryonální krvetvorby lokalizované ve žloutkovém vaku na intraembryonální probíhající hlavně v játrech. Zatímco extraembryonální krvetvorba probíhá u *c-myb* <sup>-/-</sup> normálně, intraembryonální krvetvorba selhává, což je zřetelné i absencí krvetvorných ostrůvků při mikroskopickém vyšetření parenchymu jater, játra jsou i celkově menší. Žádné další malformace nebo zřetelné anomálie u *c-myb* <sup>-/-</sup> myši popsány nebyly. Heterozygoti *c-myb* <sup>+/-</sup> jsou fenotypicky nerozlišitelní od WT kontrol (+/+).

## 5.2. *In situ* mRNA hybridizace celých embryí

Expresi genů našeho zájmu jsme sledovali pomocí *in situ* hybridizace (ISH) v celých embryích digoxigeninem značenou mRNA sondou. Použili jsme protokol podle publikací Nieto et al. (Nieto et al., 1996) a Stricker et al. (Stricker et al., 2006).

Stručně popsáno, celá embrya pro *in situ* hybridizaci byla fixována 4% PFA v PBT přes noc, následně dehydratována a uchovávána ve 100% MetOH. Hybridizace s digoxigeninem značenou antisense či jako kontrola se sense sondou byla prováděna při teplotě 70 °C po dobu 2 dnů. Digoxigenin byl vizualizován protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Hybridizovány byly vždy nejméně čtyři embrya příslušného stadia a genotypu, v nejméně dvou nezávislých hybridizacích. Porovnávání embrya genotypů <sup>-/-</sup>, <sup>+/-</sup>, <sup>+/+</sup> byla hybridizována vždy ve shodné reakci, za dodržení identických podmínek pro všechny genotypy (shodný hybridizační roztok, shodná doba hybridizace, shodná vizualizace ve druhém kroku).

Detailní protokol viz příloha.

### 5.2.1. Sondy použité na mRNA ISH

Část sond jsme vytvořili z RT-PCR produktů RNA potkana a myši, část sond je z pracovišť našich kolegů S. Strickera z Max-Planck-Institute for Molecular Genetics a N. Hubnera z Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin, Germany. Seznam primerů viz doplňující materiál publikovaných článků.

V našich projektech byly použity sondy následujících genů:

<i>Plzf</i>	antisense, sense
<i>Hoxd10-13</i>	antisense
<i>Shh</i>	antisense
<i>Bmp2</i>	antisense
<i>Bmp4</i>	antisense
<i>Bmp7</i>	antisense
<i>Fgf8</i>	antisense
<i>Sox9</i>	antisense
<i>Bmpr1b</i>	antisense
<i>c-myb</i>	antisense, sense

### 5.3. Imunohistochemie a elektronová mikroskopie

Stadia I-XIV spermatogeneze potkana v semenotvorném kanálku jsme klasifikovali za použití disekčního mikroskopu dle jejich charakteristické morfologie po prosvícení a dále zpracovávali jak uvedeno v Kotaja et al. (Kotaja et al., 2004).

Stručně popsáno, fragmenty semenotvorných kanálků korespondující s jednotlivými stádii jsme v kapce PBS umístili na spodní sklíčko potažené Vectabondem a roztřeli přímáčkutím krycího sklíčka. Poté jsme 20 sec. ochladili sklo v kapalném dusíku, skalpelem odtrhli krycí sklíčko, fixovali v 90% ethanolu 5 min a nechali vysušit v pokojové teplotě. Takto připravené nátery je možno několik týdnů skladovat při teplotě -20 °C , pro dlouhodobé skladování se doporučuje -80 °C. Obdobným způsobem byl zpracováván nátěr spermií pro elektronovou mikroskopii.

Použité primární protilátky:

nově vytvořená polyklonální králičí protilátka proti syntetickému proteinu SPNSPLRPEDLLTD, odpovídající AKS 2-21 na N konci proteinu centrobín

nově vytvořená polyklonální králičí protilátka proti C- fragmentu proteinu centrobín odpovídající AKS 530-897

monoklonální anti  $\gamma$ -tubulin (Sigma)

monoklonální anti  $\alpha$ -tubulin (Sigma)

monoklonální anti-centrin 20H5 (poskytnuta Dr. Jeffrey, Salisbury, Mayo Clinic)

polyklonální anti-keratin 5 (poskytnuta Dr. Kierszenbaum, New York , The Sophie Davis School of Biomedical Education)

K těmto primárním protilátkám byly použity příslušné sekundární protilátky konjugované s FITC a rhodamidem. Pro potřeby elektronové mikroskopie byla použita sekundární protilátka konjugovaná s 10-nm částicemi zlata.

#### **5.4. Barvení skeletu pomocí alizarinové červeně a alciánové modři (alizarin red/alcian blue)**

- 1) z odebraných fetů je odstraněno maximum tkáně tak, aby nedošlo k poškození skeletu
- 2) fixace v ethanolu 96% dle velikosti 2-4 dny
- 3) barvení v 0,03% roztoku alciánové modři 2-3 dny
- 4) dehydratace v ethanolu 2-5 dnů
- 5) ponoření/vybělení v KOH 3-4 dny
- 6) barvení v 0,001% roztoku alizarinové červeně 2-3 dny
- 7) vzestupná řada glycerinu 25%,50%,80% vždy po 1 den
- 8) uchovávat ve 100% glycerinu

## 6. Výsledky pozorování

Většina výsledků zde uvedených byla již publikována a obrazově dokumentována v článcích, které jsou součástí této práce. Pro snadnější orientaci v této dizertaci jsou ty nejdůležitější obrázky, na které text odkazuje, překopírovány do této práce, ostatní lze nalézt v uvedených publikacích.

### 6.1. Vývoj končetiny u polydaktylního *Lx* potkana

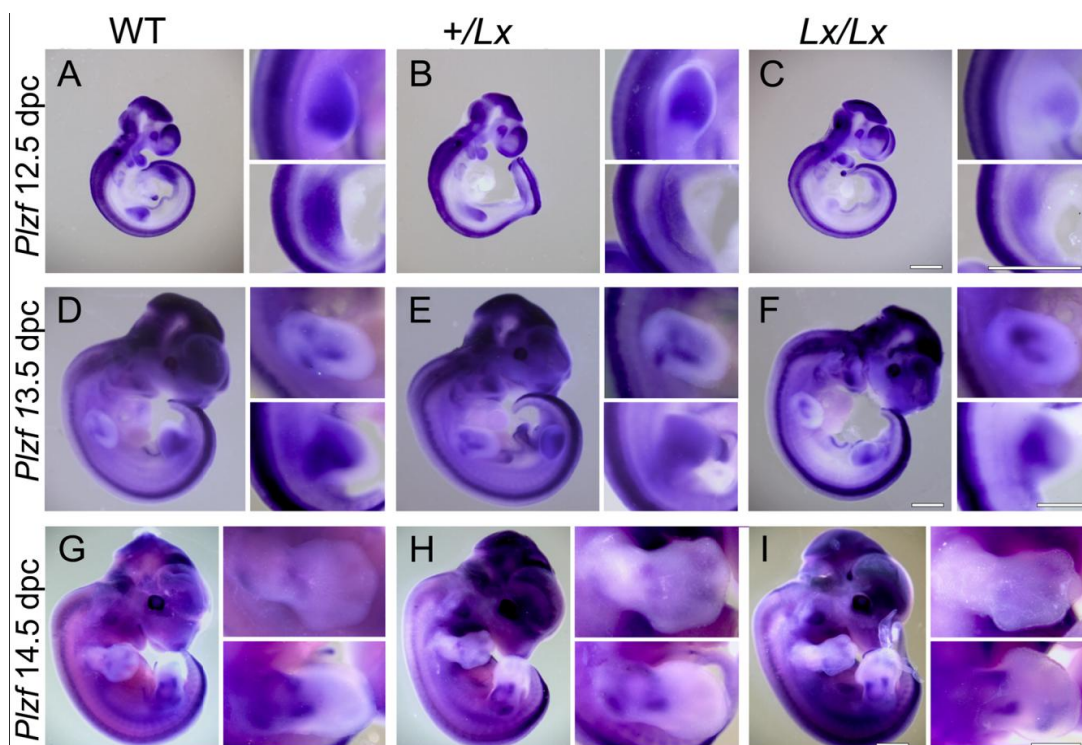
#### 6.1.1. Za *Lx* mutaci u potkana je zodpovědná delece v regulační oblasti v intronu 2 genu *Plzf*

Analýzou F2 hybridů PD5xBN se nám podařilo zúžit lokalizaci *Lx* mutace na chromozómový segment délky 155kb. Tento segment obsahoval část genu *Plzf* a dva geny *Htr3a* a *Htr3b*, podjednotky serotoninového receptoru 5-HT<sub>3</sub>. Vzhledem k publikovaným datům získaným studiem myší se jako velmi pravděpodobný kandidát zodpovědný za *Lx* mutaci jevil gen *Plzf*. Geny *Htr3a* a *Htr3b*, které jsou exprimované a funkční hlavně v nervovém systému (Thompson and Lummis, 2007) byly méně pravděpodobnými kandidáty. Sekvenování kódující sekvence *Plzf* genu (Seda et al., 2005) ani genů *Htr3a* a *Htr3b* neukázalo žádnou sekvenční variantu typickou pro *Lx* mutaci. Proto jsme obrátili svou pozornost k nekódujícím, potenciálním regulačním elementům, které jsme vytipovali na základě jejich fylogenetické genomové zakonzervovanosti. Bylo identifikováno na 70 sekvenčních variant. Většinu těchto variant jsme však také našli alespoň u jednoho z kmenů normodaktylních potkanů a mohli tak vyloučit jejich vztah k *Lx*. Jako zbývající kandidát pro *Lx* mutaci tak zůstala delece 2964bp v intronu 2 genu *Plzf*. Tato delece byla nalezena pouze u kmenů nesoucích *Lx* mutaci, nikdy nebyla nalezena u jiných kmenů, které jsme vyšetřovali. Obsahuje tři konzervované nekódující úseky, jeden z nichž byl nejvíce zakonzervovaným úsekem ze všech v rámci zkoumaného 155kb segmentu. Tento úsek je vysoce zakonzervován i u ostatních skupin obratlovců, s kterými bylo možno provést porovnání genomu (myš, člověk, drápatka, pes, vačice, kuře).

### 6.1.2. Exprese genu *Plzf* v končetinovém pupenu *Lx* potkana nastupuje později a je snižená

#### 6.1.2.1 Ověření pomocí *in situ* hybridizace

Expresa genu *Plzf* byla sledována použitím mRNA *in situ* hybridizace celých embryí. Byla porovnána potkaní embrya stáří 12,5 dpc (days post coitum) až 15,5 dpc, vždy genotypy *Lx/Lx* (homozygot s polydaktylní končetinou), *+/Lx* (heterozygot s normodaktylní končetinou), WT (wild type, nenese mutaci), obr.4



Obr. 4. Expresa *Plzf* ve vyvíjejícím se embryu potkana. ISH celých embryí. Měřítka = 1mm. (Převzato z Liška, Šnajdr et al. 2009).

U WT embryí je *Plzf* exprese homogenně přítomna v končetinových pupenech již ve stadiu 12,5 dpc. Ve stadiu 13,5 dpc se v přední končetině maximum exprese koncentruje ve středu pupenu a vytváří trojlístku podobný vzorec. V zadní končetině exprese připomíná stadium 12,5 dpc. Ve stadiu 14,5 dpc, kdy se autopodium již jasně diferencuje, signál *Plzf* z autopodia mizí, přetrvává však v proximálnějších částech horní i dolní končetiny. Ve stadiu 15,5 dpc signál *Plzf* již prakticky není v končetinách přítomen.

Vedle končetin byla exprese genu *Plzf* detekována i v mnoha dalších strukturách: v CNS, faryngových obloucích, mesonephros a oku.



U *Lx/Lx* embryí byla exprese *Plzf* genu v končetinových pupenech na první pohled významně snížena, zatímco exprese v ostatních strukturách (hlavně CNS a mesonephros) se svým vzorcem i kvantitou nelišila od kontrolních embryí.

Ve stadiu 12,5 dpc je exprese *Plzf* genu v končetinových pupenech jen obtížně detekovatelná, naznačující pozdější nastup této exprese. Ve stadiu 13,5 dpc je exprese v končetinových pupenech redukována, zvláště v přední porci mesenchymu zadní končetiny. I ve stadiu 14,5 dpc je signál v končetinových pupenech redukován, ve stadiu 15,5 dpc není již signál v končetinách přítomen. Stadium 14,5 dpc je také nejmladším stadiem, kdy již lze i morfologicky odlišit budoucí polydaktylní *Lx/Lx* fenotyp díky rozšíření přední části autopodia.

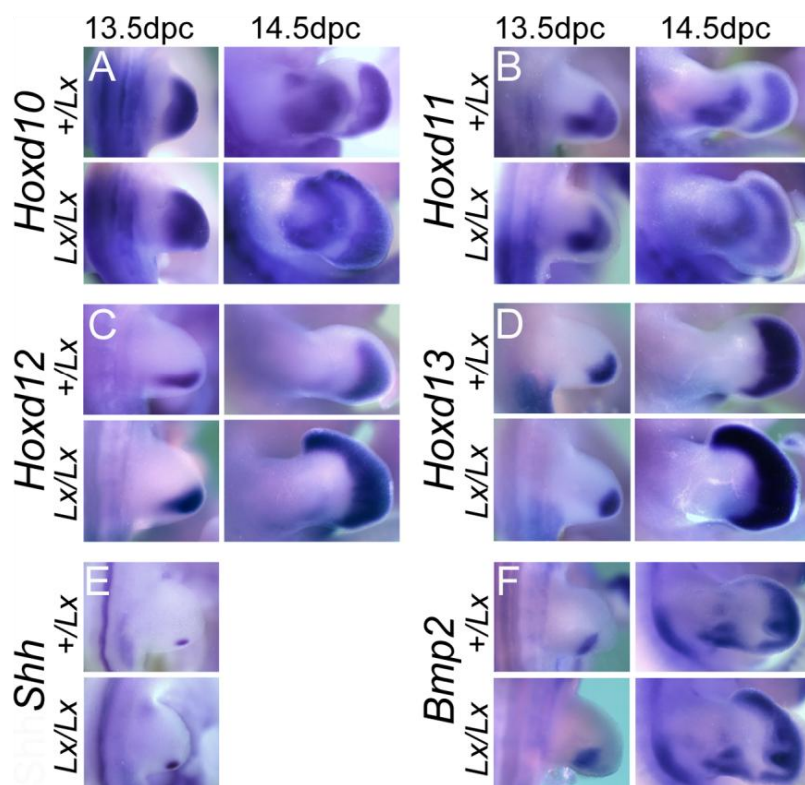
Expres *Plzf* u *+Lx* se vizuálně neodlišovala od exprese u WT.

#### 6.1.2.2 Ověření pomocí qPCR

Expres genu *Plzf* v končetinových pupenech byla dále analyzována pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR) ve stadiích 12,5 dpc a 13,5 dpc. Zjistili jsme, že *Lx/Lx* embrya mají expresi sníženou na 20-40% exprese WT kontrol. Heterozygoti *+Lx* mají úroveň exprese vyšší než *Lx/Lx* ale nižší než WT, exprese je zhruba 50-60% úrovně WT.

#### 6.1.3. Expres *Hox* genů a *Bmp2* je u *Lx* potkana změněná, zatímco expres *Shh* je beze změny

K posouzení funkčního významu snížené exprese *Plzf* genu v končetinových pupenech *Lx/Lx* jsme ověřili expresi genů u kterých je známá jejich regulace tímto genem, obr 5. Protože *Plzf* je přímým represorem *HoxD* genů (Barna et al., 2002), soustředili jsme se na geny *Hoxd10-Hoxd13*, které jsou klíčové právě pro vývoj autopodia. Na předních končetinách, které jsou normodaktylní, jsme nenalezli žádnou odlišnost exprese mezi *Lx/Lx* a *+Lx* v žádném ze sledovaných stadií (12,5 dpc - 14,5 dpc). Na zadních končetinách nebyla pozorována odlišnost exprese mezi *Lx/Lx* a *+Lx* ve stadiu 12,5 dpc (data neukazujeme) a 13,5 dpc, kdy končí první vlna exprese *Hox* genů. Avšak ve stadiu 14,5 dpc, kdy probíhá druhá vlna exprese *Hox* genů, dochází u *Lx/Lx* k posunu exprese *Hoxd10-Hoxd13* směrem k palcové části autopodia. I expres genů *Hoxd10* a *Hoxd11* v budoucím zeugopodiu je posunuta do jeho přední poloviny. V zeugopodiu tak vytvářejí symetrický, podkovu připomínající vzorec, odlišný od kontrolních *+Lx* končetin.



Obr. 5. Expres *Hoxd10-13*, *Bmp2* a *Shh* v zadních končetinách vyvíjejícího se embrya potkana. ISH celých embryí. Měřítka = 1mm. (Převzato z Liška, Šnajdr et al. 2009).

***Bmp2*** je exprimován v zadní části mesenchymu zadní končetiny ve stadiu 13,5 dpc shodně u *Lx/Lx* i *+/Lx* kontrol. Ve stadiu 14,5 dpc je shodná exprese v zeugopodiu, po obvodu autopodia a v interdigitálních prostorech s maximem ve 3. a 4. prostoru. U *Lx/Lx* embryí je však navíc viditelný zřetelný posun exprese směrem k palci, podobný jako u *Hox* genů.

Dalším genem, který jsme testovali byl ***Shh***, jehož oblast exprese je rozšířena u mnoha modelů preaxiální polydaktylie. Nenalezli jsme žádný rozdíl v rozsahu či načasování exprese *Shh* u *Lx* potkanů a kontrol, exprese *Shh* zůstává omezena na oblast ZPA.

#### 6.1.4. Naše nálezy dokládají roli *Plzf* jako negativního regulátora exprese *Hox* genů v končetině

V pupenu zadní končetiny, kde exprese *Plzf* nastupuje později a její rozsah zvláště v přední části pupenu je snížen, je exprese genů *Hoxd10-Hoxd13* posunuta do palcové poloviny autopodia. To odpovídá údajům získaných studiemi myší, kdy *Plzf* funguje jako přímý negativní regulátor exprese těchto genů právě v přední části autopodia (Barna et al., 2002).

### **6.1.5. Znamky postižení jiných orgánových systémů než končetin nebyly nalezeny**

*Lx/Lx* potkan kmene PD5 nevykazuje žádné známky postižení zeugopodia, stylopodia, osového skeletu či fertility samců, na rozdíl od myšího modelu *Plzf*<sup>-/-</sup> a *Plzf*<sup>lu/lu</sup>.

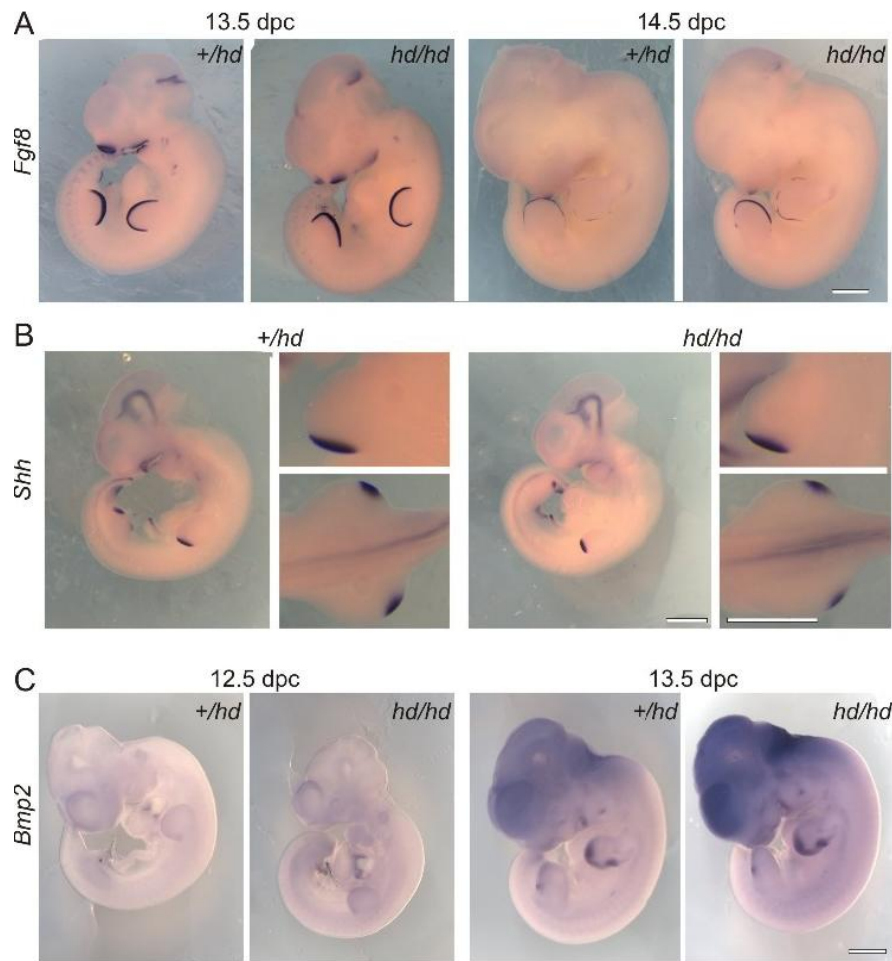
## **6.2. Vývoj končetiny u hypodaktylního *hd* potkana**

### **6.2.1. Za *hd* mutaci u potkana je zodpovědné zkrácení proteinu centrobín**

*hd* lokus se nám podařilo definovat do 0,14 cM dlouhého úseku tvořeného 464kb na chromozómu 10. Tento úsek však zahrnoval 16 genů, z nichž ani jeden není v literatuře jakkoliv asociován s vývojem končetiny. Naopak v testes (pro *hd* je typická i porucha spermatogeneze) je exprimováno 12 z nich. Sekvenování těchto genů odhalilo několik synonymních i nesynonymních nukleotidových polymorfismů mezi jednotlivými kmeny potkanů. Pouze jedna sekvenční varianta byla přítomna výhradně u *hd*. Jednalo se o 8360 bp dlouhý úsek (inzert) DNA vložený mezi exony 10 a 11 genu *Cntrob* (*Lip8*) retrovirového původu (Wang et al.). Tento inzert obsahuje předčasný stop kodón, translace *hd* alely tak vede k syntéze zkráceného proteinu centrobín o délce 480 AKS, kdy normální délka proteinu je 897AKS.

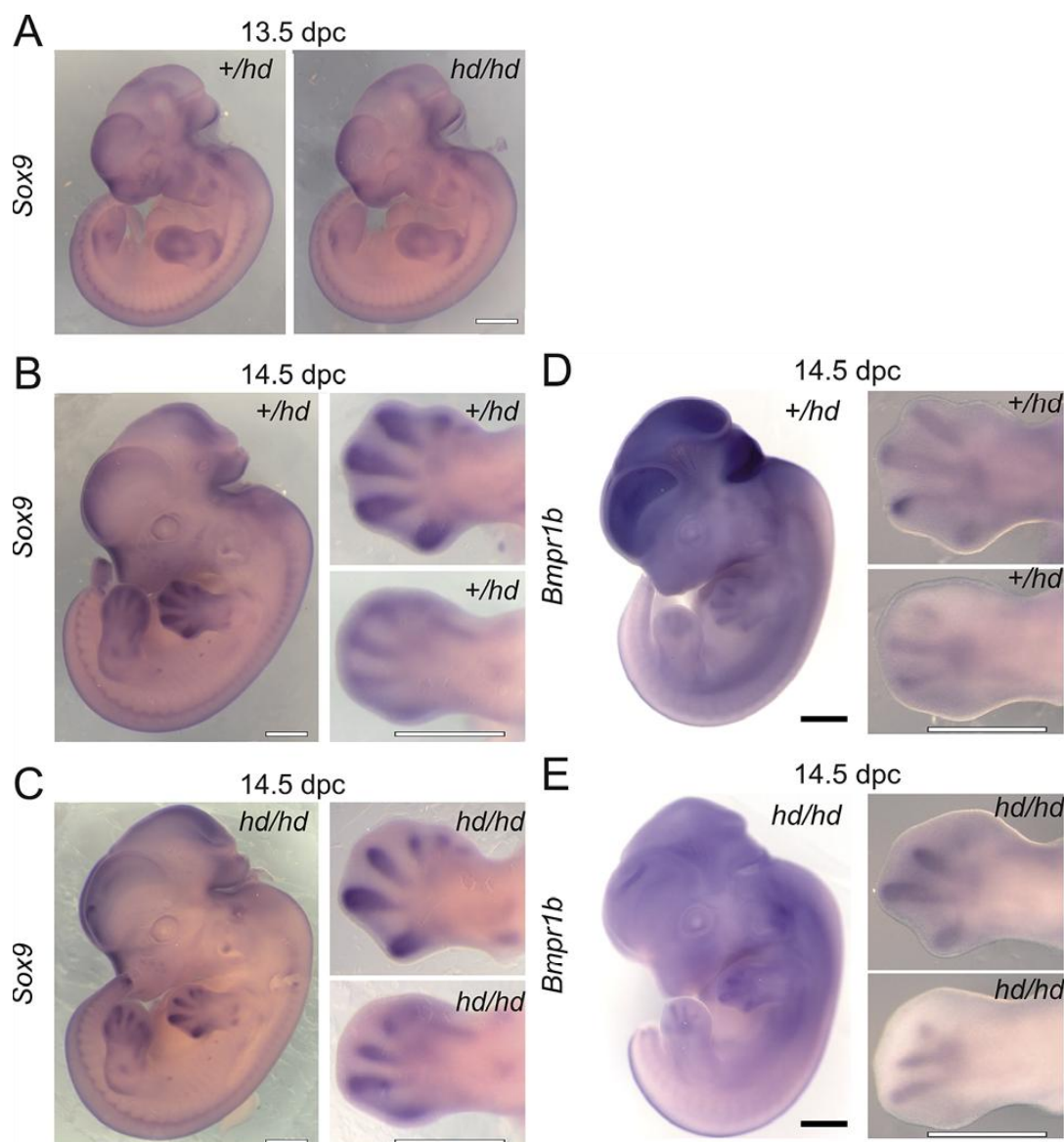
### **6.2.2. Expresse některých klíčových genů pro vývoj končetiny je u *hd* potkana změněná**

Vzhledem k neexistenci literárních údajů, které by naznačovaly jakýkoliv vztah genu *Lip8* ke genům ovlivňujícím vývoj končetiny, provedli jsme vyšetření exprese panelu genů důležitých ve vývoji končetiny, obr.6.



Obr. 6. Expres *Fgf8*, *Shh*, *Bmp2* ve vyvíjejícím se embryu potkana. ISH celých embryí. Měřítka = 1mm. (Převzato z Liška et al. 2010).

Expres *Fgf8*, markeru AER, ani *Shh*, klíčového faktoru ZPA, nejsou u *hd/hd* změněny. Expres *Bmp2*, 4, a 7 je také beze změn.



Obr. 7. Expres *Sox9*, *Bmpr1b* ve vyvíjejícím se embryu *hd* potkana. ISH celých embryí. Měřítka = 1mm. (Převzato z Liška et al. 2010).

Naopak exprese *Sox9*, markeru chondrogenese a *Bmpr1b*, jednoho z receptorů BMP, je u *hd/hd* redukována u prstu II a III, obr.7, tedy u prstů, které jsou u *hd* potkana postiženy. Prst II obvykle chybí a prst III je zkrácen (více viz kapitola 5.2).

U normodaktylní *+/hd* kontroly jsou ve stadiu 14,5 dpc již vytvořeny *Sox9* pozitivní chrupavčité základy prstů dosahující do periferie autopodia k zóně progrese pod kontrolou AER. U *hd/hd* je vytvořena zřetelná mezera mezi distálním koncem *Sox9* pozitivních prstů II a III a zónou progrese. Ostatní prsty I, IV a V dosahují až do zóny progrese a odpovídají *+/hd*. Identický nálezn platí také pro expresi *Bmpr1b* ve stadiu 14,5 dpc, která u prstu II a III nedosahuje distálně až k periferii autopodia, zatímco u ostatních prstů odpovídá *+/hd* kontrole.

Expres *Sox9* u *hd/hd* ve stadiu 13,5 dpc je spíše difusní v mezenchymu pupenu a odpovídá *+/hd*. Expres *Bmpr1b* u *hd/hd* ve stadiu 13,5 dpc také odpovídá *+/hd* kontrole.

Naše výsledky ukazují, že při zachování normální exprese *Bmp2,4,7* chybí expres *Bmpr1b* v distální porci prstů II a III. To vede v těchto místech k chybění exprese *Sox9* (který je downstream od BMP signalizace, viz kapitola 3.1.5) a následně k absenci kondenzace chrupavčitého základu a následného vývoje příslušných prstů.

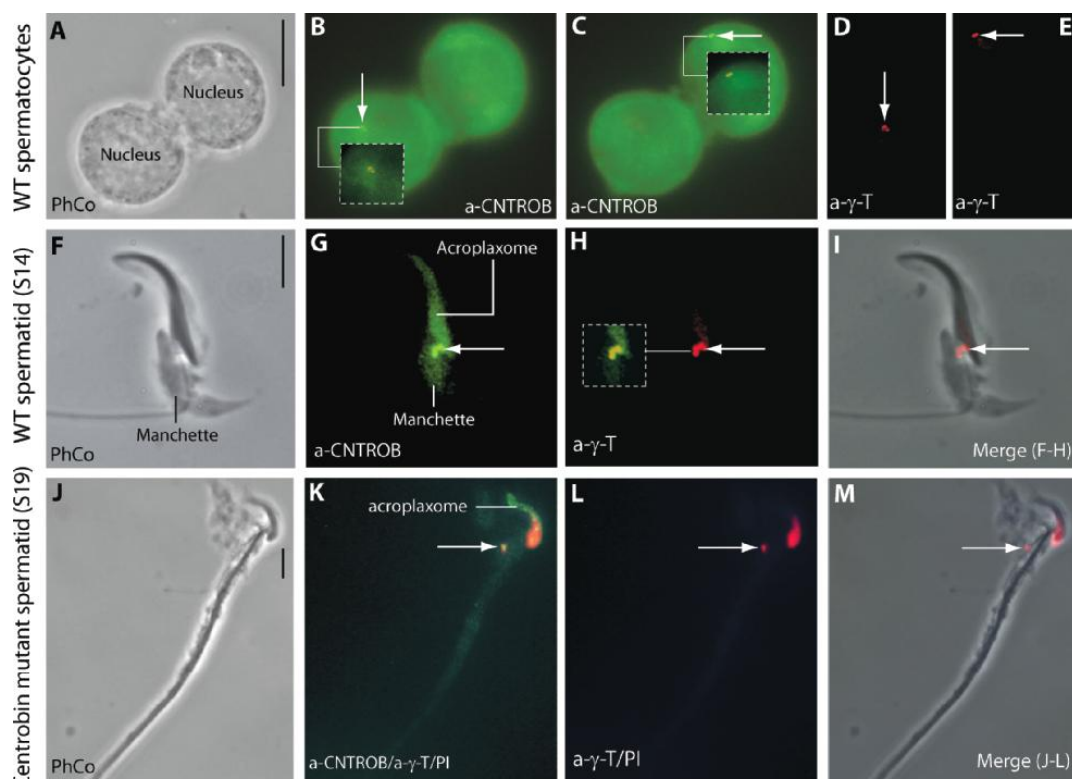
### **6.2.3. Poruchy spermatogeneze u *hd* potkana**

Pomocí polyklonální protilátky proti AKS 7-21 N-konce proteinu centrobin byl ve varlatech WT prokázán protein o velikosti 110kDa, zatímco u *hd/hd* protein o velikosti 55kDa. U heterozygota *+/hd* jsou přítomny proteiny oba, potvrzující, že ten o nižší molekulové hmotnosti je mutací zkrácený centrobin. Naopak protilátka vytvořená proti AKS 530-897 C-konce proteinu centrobin, tedy té části, která u *hd/hd* chybí, prokáže pouze WT centrobin.

Spermatogeneze u *hd/hd* probíhá normálně do stadia spermatid. Postižena je až fáze dozrávání spermatid, tedy spermiogeneze. Během tohoto procesu dochází k prudkému poklesu počtu spermatid. Většina elongujících se spermatid je dekapitována či vykazuje jiné závažné morfologické defekty. V nadvarleti spermie zcela chybějí.

#### **6.2.3.1 centrobin je lokalizován v centriolu, v akroplaxómu a v manžetě spermatid; u *hd* potkana je centrosóm u prodlužujících se spermatid v abnormální pozici a organizace akroplaxómu a manžety je porušena**

Ve spermatocytech WT potkanů byla lokalizována imunoreaktivita centrobinu v centrozómu, kde kolokalizuje s imunoreaktivitou  $\gamma$ -tubulinu, markerem centriolu, obr 8. V prodlužující se spermatidě WT kontrol (stadium S14) jsou zřetelné dvě tečky ve dvou centriolech tvořících centrosóm. Mírný posun signálu centrobinu vůči  $\gamma$ -tubulinu svědčí o různé distribuci těchto proteinů v rámci centriolu. V prodlužující se spermatidě *hd/hd* je lokalizace centrobin pozitivních centriolů v abnormální pozici, posunuta distálně od normální pozice centriolů v těsné blízkosti jádra.

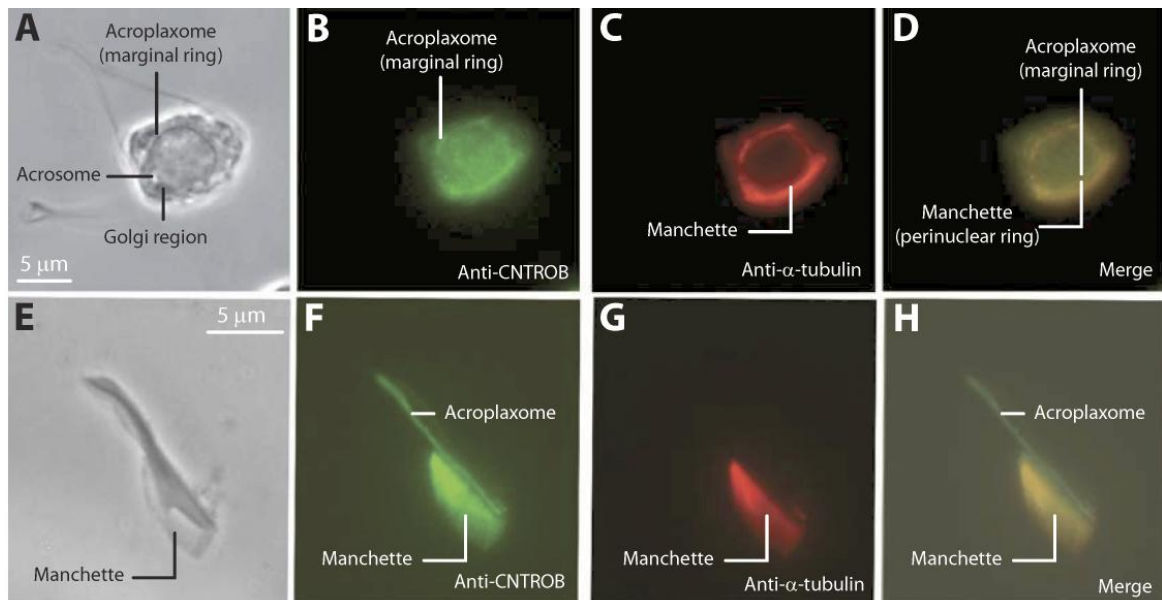


Obr. 8. Lokalizace centrobinu ve spermatocytech a spermatidách. Pozitivita v centriolu, akroplaxómu, v perinukleárním prstenci.  $\gamma$  tubulin použit jako marker centriolu. Měřítka = 5  $\mu$ m. (Převzato z Liška, Gosele et al. 2009).

Velmi zajímavou lokalizaci centrobinu u WT kontrol jsme pozorovali u kulatých i prodlužujících se spermatid, obr.9., centrobin je difusně přítomen v akroplaxómu s maximem v jeho okrajovém prstenci a v manžetě kolem jádra. Akroplaxóm je pro spermii specifická cytoskeletální struktura spojující akrozom a jádro spermie. Manžeta, prstencovitý útvar kolem hlavičky prodlužující se spermatidy, se podílí na jejím tvarování během spermiogeneze.

Elektronová mikroskopie potvrdila u *hd/hd* abnormální pozici centriolu a dále prokázala abnormální pozici perinukleárního prstence manžety vedoucí k zaškrcení hlavičky vyvíjející se prodlužující se spermatidy. Chybná funkce prstence tak nejspíše vede k dekapitaci spermie typické pro *hd/hd*. Pro postižení akroplaxómu je typické chybění filament okrajového prstence, normálně obsahujících velké množství keratinu 5, který u *hd/hd* chybí.





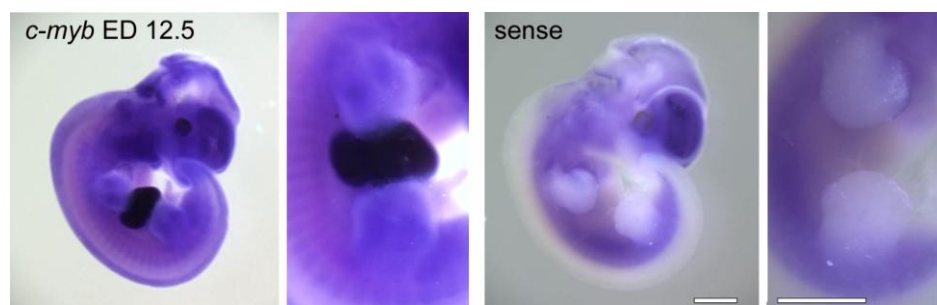
Obr.9. Lokalizace centrobinu ve spermatidách. Pozitivita v akroplaxómu s maximem v jeho okrajovém prstenci a v perinukleární manžetě.  $\alpha$  tubulin použitý jako marker perinukleární manžety. (Převzato z Liška, Gosele et al. 2009).

### 6.3. *c-myb* při vývoji končetiny myši

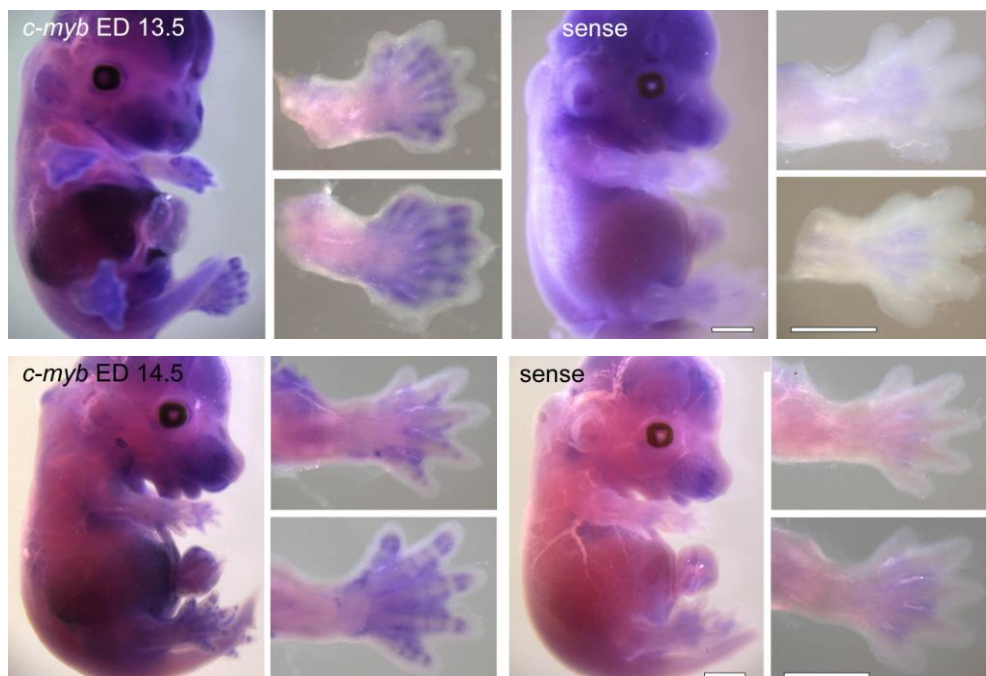
#### 6.3.1. *c-myb* je exprimován ve vyvíjející se končetině

Vzhledem k námi prokázané roli *c-myb* v Bmp4 signalizační kaskádě (Karafiat et al., 2005), která je klíčová i pro vývoj končetiny, nás zajímala případná role genu *c-myb* při jejich vývoji. V literatuře nebyly dosud popsány ani exprese *c-myb* ve vyvíjejících se končetinách myši, ani případné postižení končetin u *c-myb*<sup>-/-</sup>.

Pomocí WM ISH jsme vedle jater, retiny, nosního epitelu, vomeronasálního orgánu whisker foliklů a CNS prokázali zřetelnou expresi *c-myb* ve vyvíjejících se končetinách, obr 10.







Obr.10. . Expres *c-myb* ve vyvíjejícím se embryu myši. ISH celých embryí. Měřítko = 1mm.

Ve stáří 12,5 dpc je exprese homogenně rozptýlená v obou končetinových pupenech a je relativně slabá. Ve stádiích 13,5 dpc a 14,5 dpc je exprese *c-myb* v končetinách velmi zřetelná, s výrazným signálem podél vyvíjejících se paprsků prstů. Jde pravděpodobně o perichondrium, vrstvu buněk na povrchu kondenzujících základů článků prstů ze které se posléze vyvíjí periost.

### 6.3.2. končetina *c-myb*<sup>-/-</sup> nejeví morfologické odlišnosti ve srovnání s kontrolní WT končetinou

Pro posouzení funkce genu *c-myb* při vývoji končetiny jsme detailně srovnávali morfologii celých embryí i série řezů končetinami *c-myb*<sup>-/-</sup> a WT jedinců.

Případný fenotypový projev delece genu (*c-myb*<sup>-/-</sup>) jsme studovali u všech dostupných stádií, kdy se vytváří budoucí končetiny, tedy 12,5 - 14,5 dpc. Nenalezli jsme v těchto stádiích ve vývoji končetin ani jinde žádnou morfologickou odlišnost, kterou bychom mohli považovat za specifický fenotypový projev *c-myb*<sup>-/-</sup>.

## 7. Diskuse

### 7.1. Vývoj končetiny u polydaktylního *Lx* potkana

Exprese *Plzf* genu u WT potkana je srovnatelná s expresí ortologního genu u myši (Avantaggiato et al., 1995). U *Lx/Lx* potkana je zřetelný pozdější nástup a snížení exprese genu *Plzf* v končetinách, zatímco exprese tohoto genu v ostatních orgánových systémech je srovnatelná s kontrolou. To může vysvětlovat proč je *Lx* fenotyp omezen na končetinu, zatímco u *Plzf*<sup>-/-</sup> myši je postižen také osový skelet a spermiogenese. U PD5 kmenu je však postižena pouze zadní končetina, přestože redukce exprese *Plzf* nastává shodně v přední i zadní končetině. Tento fakt neumíme vysvětlit. Stejně tak fenotypový projev u myši *Plzf*<sup>-/-</sup> (Barna et al., 2000) a dvojité delece *Plzf*<sup>-/-</sup> a *Gli3*<sup>-/-</sup> (Barna et al., 2005) je omezen v přes 90% případů výhradně na zadní končetiny. Davies (Davies et al., 1999) popsal expresi genu homologního genu *Plzf* v pupenu přední končetiny myši, jeho funkce by tak mohla v přední končetině kompenzovat absenci genu *Plzf*.

Výsledky ISH u *+Lx* a WT (*+/+*) ukazují při vizuálním porovnání srovnatelný rozsah i intenzitu signálu, přestože qPCR prokázala, že exprese *+Lx* je na úrovni 50-60% exprese WT. Výsledek qPCR bezpochyby skutečnou expresi *Plzf* kvantifikuje mnohem přesněji. Výsledky qPCR odpovídají také lépe představě genové exprese heterozygota někde mezi oběma póly homozygota a WT kontroly. Tato kvantifikace *Plzf* exprese byla provedena na žádost jednoho z recenzentů před přijetím publikace. Bylo pro nás velkým poučením, že vizuálně rozsahem a intenzitou shodný vzorec signálu ISH u *+Lx* a WT ve skutečnosti reprezentuje situaci, kdy *Plzf* exprese u *+Lx* je zhruba poloviční v porovnání s WT.

Delece *Plzf* genu u myši (*Plzf*<sup>-/-</sup>) způsobuje relativně široké spektrum postižení zadní končetiny v rozsahu všech tří segmentů končetiny (stylopodium, zeugopodium, autopodium) s různým postižením prstů jako chybění palce (oligodaktylie), tříčlankový hallux či preaxiální polydaktylie. Zřídka (méně než 10%) je obdobně postižena též horní končetina. Naproti tomu postižení u našeho kmene PD5 je poměrně uniformní s jen omezenými fenotypovými variantami. To může být z důvodu hypomorfního charakteru *Lx* mutace, kdy 20-40% exprese úrovně WT je zachována. V neposlední řadě *Lx* fenotyp je posuzován na uniformním genetickém pozadí inbredního kmene PD5 a je jím tak pravděpodobně stabilizován. Delece *Plzf* u myši byla studována na smíšeném

genetickém pozadí, které se může podílet na variabilitě jejího fenotypového projevu. Tuto představu podporuje i fakt, že u jiných potkaních kmenů nesoucích mutaci *Lx* je její fenotypový projev variabilní (Printz et al., 2003) relativně často se např. objevuje tříčlankový pollex na horní končetině, oligodaktylie na dolní končetině, fenotyp se projevuje i u heterozygotů (+/*Lx*). Toto spektrum postižení se překrývá se spektrem postižení tak, jak bylo popsáno u delece *Plzf* u myši. Můžeme říci, že spektrum fenotypů u myši se smíšeným genetickým pozadím odpovídá součtu fenotypů potkana různých kmenů s různým genovým pozadím. (Naše studie byla provedena výhradně na kmeni PD5 -detailní popis viz metody).

Ukázali jsme, že *Lx* mutace způsobuje polydaktylii nezávisle na *Shh*. Změna exprese *Hoxd10-Hoxd13* genů ukazuje, že tyto geny hrají roli při vývoji polydaktylie u *Lx* potkana. Tento nálezkoresponduje s analýzou *Plzf* *-/-* myši (Barna et al., 2000), která ukazuje obdobné změny v expresi *HoxD* genů. Vztah *Shh* a *HoxD* je velmi složitý a komplexní a pravděpodobně jiný při regulaci první a jiný při regulaci druhé vlny exprese *HoxD*. Vyplývá to i z prostého faktu, že první vlna exprese *HoxD* genů předchází expresi *Shh*, druhá vlna exprese *Shh* následuje. První fáze exprese *HoxD* genů, zvláště vymezení exprese *Hoxd10-Hoxd13* genů v zadní části pupenu je klíčové pro spuštění a vymezení rozsahu exprese *Shh* v rámci ZPA (Zakany et al., 2004). Předpokládá se, že naopak druhá vlna exprese *Hoxd10-Hoxd13* genů je indukována, nebo přinejmenším výrazně modulována genem *Shh* a jeho protihráčem *Gli3* (Zuniga and Zeller, 1999). Naše práce na *Lx* potkanu i práce Barny et al. na *Plzf* *-/-* myši (Barna et al., 2000) ukazují, že navzdory normální expresi *Shh* je exprese *HoxD* genů posunuta směrem k palci, což vede k vývoji preaxiální polydaktylie. To ukazuje, že *Shh* a *Plzf* jsou spíše dva na sobě nezávisle působící faktory než že *Plzf* slopuží jako mediátor efektu *Shh*. Velmi zajímavé v tomto směru jsou výsledky práce Barny et al. (Barna et al., 2002), která mimojiné řešila otázku proč se negativní regulační efekt *Plzf* na geny *Hoxd10-13* uplatňuje pouze v přední části končetinového pupenu a neuplatňuje se v jeho zadní části, přestože je exprese *Plzf* přítomna homogenně v celém pupenu. Barna et al. ukazují, že negativní regulační efekt *Plzf* je potlačen v zadní části pupenu signály jako je *Shh* nebo kyselina retinová. Ve shodě s tímto pozorováním se zdá být též fakt, že úplná absence *Plzf* u *Plzf* *-/-* myši a snížená exprese *Plzf* pouze v přední části končetinového pupenu u *Lx* potkana ve stadiu 13,5 dpc, kdy exprese v zadní části se zdá normální, má stejný fenotypový projev, tedy stejný funkční dopad. Tento fenotypový projev však může být způsoben (spoluzpůsoben) i o den zpožděným

nástupem exprese tohoto genu, kdy ve stadiu 12,5 dpc je končetina *Lx* potkana bez signálu, zatímco u *+Lx* i WT kontroly je u shodného stadia signál již zřetelný.

## 7.2. Vývoj končetiny a spermatogeneze u hypodaktylního *hd* potkana

*hd* mutace je způsobena inzercí retrovirového elementu do intronu 10 genu *Cntrob*. Translace *hd* alely vede ke zkrácení C konce proteinu centrobín.

Role centrobínu je známa při dělení centriolů, chybění centrobínu v HeLa buňkách vede k prodloužení mitózy a poruše cytokineze (Zou et al., 2005)

Naše práce jako první popisuje vliv centrobínu na vývoj končetiny. Fenotyp *hd* mutace je unikátní, neznáme žádný, který by se s ním shodoval ani u člověka ani u myši či jiného experimentálního zvířete. *Hd* mutace stejného jména u myši má poněkud odlišný fenotyp a je způsobena mutací genu *Hoxa13* (Post et al., 2000).

Při studiu exprese genů klíčových pro regulaci vývoje končetiny jsme pozorovali změny v expresi některých z nich korespondující s fenotypem končetiny. Při zachování normální exprese *Bmp2,4,7* chybí exprese *Bmpr1b* v distální části prstů II a III obou končetin. To vede v těchto místech k chybění exprese *Sox9*, jehož exprese je spouštěna BMP signalizací. Mutace *BMPR1B* u člověka (Lehmann et al., 2003) způsobuje brachydactylii typu A2. Je zajímavé, že u pacientů s tímto onemocněním je zkrácen právě prst II, který je nejvíce postižen i u *hd* potkana. Ovšem otázka, jak *hd* mutace ovlivňuje expresi *Bmpr1b*, zůstává zatím nezodpovězena. Představa vycházející z modelu zóny progrese popisuje růst prstů z mezenchymu této zóny pod kontrolou AER. Tento model byl nedávno doplněn údaji molekulárně-genetickými (Montero et al., 2008) popisující specializovanou skupinu buněk na vrcholku každého z prstů, exprimující *Bmpr1* a *Sox9*, jejichž funkcí je rekrutovat mezenchymové buňky ze zóny progrese a kontrolovat jejich diferenciaci do základů prstů. Absence exprese těchto genů v distální části prstu II a III u *hd* potkana pravděpodobně způsobí, že buňky příslušných prstů nejsou správně instruovány a nejsou diferencovány. Tyto buňky mohou později zaniknout apoptózou, stejně jako ostatní nediferencovaný meziprstní mezenchym.

U člověka je centrobín prokázán v různých tkáních, nejvyšší exprese genu *Cntrob* je v testis (Zou et al., 2005). Naše práce prokazuje centrobín v centrozómu spermatocytů a spermatid, v akroplaxómu s maximem v jeho krajovém prstenci a v manžetě kolem hlavičky vyvíjející se spermatidy. *hd* mutace vede k defektu spermiogeneze vedoucí k deformitám a ztrátě hlavičky spermatid, k poruše organizace akroplaxómu a manžety.

Jestli tento klíčový význam pro spermiogenezu má centrobín sám o sobě, či jiný s centrobínem asociovaný protein nelze z našich výsledků rozhodnout. Zdá se, že *hd* mutace vede ke kolapsu celé populace prodlužujících se spermatid vedoucí až k úplné absenci spermií v epididymis. *Cntrob* tak může být kandidátním genem pro obdobné syndromy způsobující infertilitu u člověka, kterým dominuje morfologicky podobný nález dekapitovaných spermií (teratozoospermia) (Chemes et al., 1999).

### 7.3. Role *c-myb* ve vývoji končetiny myši

Prokázali jsme silnou a zřetelnou expresi *c-myb* ve vyvíjejících se končetinách stadií 12,5 - 14,5 dpc. Přestože studiem exprese tohoto genu u myši se zabývalo v minulosti několik prací (Sitzmann et al., 1995) a přestože popisují expresi *c-myb* v různých tkáních i v těchto námi zkoumaných stadiích 12,5-14,5 dpc, exprese v končetinách popsána zatím nebyla. Ve všech těchto pracech byla ISH prováděna na řezech, ne na celých embryích. Na transversálních histologických řezech zaujímá řez končetinou relativně malou plochu a pokud je signál ve srovnání se signálem okolních tkání slabší a na řezu nedochází k jeho sumaci z více vrstev buněk, může být nezřetelný. To je důvod, jak se domníváme, proč na celých embryích relativně robustní exprese *c-myb* nebyla na řezech v končetinách pozorována a popsána již v předchozích pracech. Nepodařilo se nám prokázat vliv vyřazení genu *c-myb* na fenotyp končetiny. K dispozici jsme měli pouze embrya *c-myb*<sup>-/-</sup> do stadia 14,5 dpc, neboť tato embrya umírají během 15. embryonálního dne na systémovou anemii. Je tedy možné, že vyřazení genu se fenotypicky na končetinách projeví až v pozdějších etapách vývoje, tak jak bylo prokázáno např. u střevních krypt použitím tkáňově specifického vyřazení tohoto genu (Malaterre et al., 2007). Zatímco ve stádiu 14,5 dpc nejsou žádné změny vývoje střeva patrné, u narozených myší s vyřazeným *c-myb* genem pouze ve střevě dochází k významné redukci střevních krypt a omezení možnosti regenerace enterocytů. Obdobně postižení mozku až v pozdějších etapách vývoje dokumentuje specifické vyřazení tohoto genu v nervové tkáni (Malaterre et al., 2008).

Z výsledků WM ISH nemůžeme s naprostou jistotou určit lokalizaci *c-myb* exprese. S největší pravděpodobností se jedná o perichondrium, vrstvu buněk na povrchu kondenzujících základů článků prstů, z perichondria se posléze vyvíjí periost. Teoreticky by však mohlo také jít o k perichondriu přiléhající vrstvu meziprstního mezenchymu. K definitivnímu potvrzení lokalizace *c-myb* exprese (i pro připravovanou publikaci) budeme muset provést *ISH* na řezech.

#### 7.4. Proč právě pět prstů?

Naše práce s hypodaktylním a polydaktylním kmenem potkana nás přivádí k velmi zajímavé otázce proč má většina suchozemských čtvernožců právě pět prstů.

Co je příčinou tohoto faktu, že se pět (či méně) prstů ustanovilo jako norma je předmětem živých debat vývojových biologů. Zatímco k redukci počtu paprsků autopodia během evoluce čtyřnožců došlo poměrně často, k opačnému procesu – tedy k evoluční stabilizaci nadpočetných prstů, zdá se, nikdy nedošlo. Je to poměrně překvapivé, uvážíme-li, jak se polydaktylie, nejen u člověka, poměrně často objevuje. Je-li nadpočetný prst jen nefunkčním přívěskem, je selekční protitlak zřejmý, v mnohem vzácnějším případě, kdy je prst funkční, to již tak zřetelné není. Dokonce existuje mnoho případů, kdy by prst navíc poskytoval selekční výhodu, např. končetina pro hrabání u krtek, nebo známý příklad končetiny pandy uzpůsobené pro trhání listů bambusu. Přesto nikdy nedošlo k vytvoření skutečné polydaktylie, prst „navíc“ je v obou těchto případech u krtek i u pandy vytvořen zvětšením sesamské kosti zápěstí.

Asi ještě překvapivější je tento fakt ve světle paleontologických nálezů, které ukazují, že první suchozemští obratlovci byli polydaktylní. Patří mezi ně *Acanthostega* (před 365 mil. let) s osmi prsty na předních i zadních končetinách a *Ichtyosthea* (před 374 – 359 mil. let) se sedmi prsty na zadních končetinách (fosilie předních končetin se nedochovala) (Coates et al., 2002). Na ještě starší fosilii *Tiktaalik* (před 375 mil. let) jejíž poměrně zachovalá přední končetina je přechodem mezi ploutví ryby a končetinou obojživelníka (Shubin et al., 2006), nelze ještě jednotlivé paprsky prstů rozlišit.

Někteří autoři spekulují o negativním pleiotropním efektu postižení končetin, kdy fenotypový projev je jen zdánlivě omezen pouze na končetinu, ale ve skutečnosti vždy celkově snižuje fitness jedince. Zdá se, že při podrobném sledování dětí s redukčními defekty končetin, které byly diagnostikovány při porodu jako izolovaná postižení, což bylo zhruba 80% případů, je zaznamenána během dalšího vývoje poněkud vyšší mortalita i morbidita ve srovnání se zdravou populací (Froster-Iskenius and Baird, 1989). Toto bylo publikováno pro případy redukčních defektů končetin a nikoliv polydaktylie a platí jen pro menšinu dětí s izolovaným (nebo zdánlivě izolovaným) postižením, nikoliv pro všechny takto postižené děti. Tato čísla tak spíše svědčí o nedostatečném vyšetření těchto dětí po narození, kdy přidružené vady mimo končetinu nejsou diagnostikovány a projeví se svými komplikacemi až v dalších letech vývoje.

## 8. Souhrn hlavních výsledků a závěrů disertace

### 8.1. *Lx* mutace

Za polydaktylní *Lx* mutaci u potkana je zodpovědná delece 2964bp dlouhého úseku v intronu 2 genu *Plzf*. Tento úsek obsahuje vysoce zakonzervovanou nekódující, pravděpodobně regulační oblast.

Expresce genu *Plzf* v končetinovém pupenu *Lx* potkana nastupuje později a je snižená.

Expresce *Hox* genů a *Bmp2* je u *Lx* potkana posunutá směrem k palci, expresce *Shh* je beze změny.

Nenalezli jsme známky postižení jiných orgánových systémů než končetin.

### 8.2. *hd* mutace

Za hypodaktylní *hd* mutaci u potkana je zodpovědný inzert DNA dlouhý 8360 bp vložený mezi exony 10 a 11 genu *Cntrob*. Tento vložený úsek vede při translaci ke zkrácení proteinu zhruba na polovinu, z 897 aminokyselin na 480.

Expresce *Bmpr1b* a *Sox9* chybí v distální části paprsku prstů II a III *hd* potkana, což koresponduje s fenotypovým projevem této mutace, kdy prst II chybí a prst III je obvykle velmi redukován

centrobin jsme prokázali v centrozómu spermatocytů a spermatid, v akroplaxómu s maximem v jeho krajovém prstenci a v manžetě.

U *hd* mutace je zásadně postižena spermiogeneza projevující se atypickým umístěním centrosómu dále od jádra, poruchou morfolgie akroplaxómu a manžety. To vede ke vzniku deformit a ztrátě hlavičky spermatid, dochází ke kolapsu celé populace prodlužujících se spermatid a k úplné absenci spermií v epididymis.

### 8.3 *c-myb*

Prokázali jsme že *c-myb* je exprimován ve vyvíjejících se končetinách, s maximem ve 13,5 a 14,5 dpc. Expresce je lokalizována podél vyvíjejících se paprsků prstů, pravděpodobně v perichondriu.

Morfologie končetin *c-myb* *-/-* těchto stadií v porovnání s WT kontrolou nevykazují žádné odlišnosti. Gen *c-myb* není tedy nezbytný pro vývoj končetiny do stadia 14,5dpc, kdy *c-myb* *-/-* embryo umírá na systémovou anémii.

## 9. Seznam literatury použité v disertaci

- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., de Crombrughe, B., 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 16, 2813-28.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., McCrea, P. D., de Crombrughe, B., 2004. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18, 1072-87.
- Amaravadi, L., King, M. W., 1994. Characterization and expression of the Xenopus c-Myb homolog. *Oncogene.* 9, 971-4.
- Avantaggiato, V., Pandolfi, P. P., Ruthardt, M., Hawe, N., Acampora, D., Pelicci, P. G., Simeone, A., 1995. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci.* 15, 4927-42.
- Avantaggiato, V., Pandolfi, P. P., Ruthardt, M., Hawe, N., Acampora, D., Pelicci, P. G., Simeone, A., 1995. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci.* 15, 4927-42.
- Bakrania, P., Efthymiou, M., Klein, J. C., Salt, A., Bunyan, D. J., Wyatt, A., Ponting, C. P., Martin, A., Williams, S., Lindley, V., Gilmore, J., Restori, M., Robson, A. G., Neveu, M. M., Holder, G. E., Collin, J. R., Robinson, D. O., Farndon, P., Johansen-Berg, H., Gerrelli, D., Ragge, N. K., 2008. Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am J Hum Genet.* 82, 304-19.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V., Tabin, C. J., 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2, e216.
- Barna, M., Hawe, N., Niswander, L., Pandolfi, P. P., 2000. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet.* 25, 166-72.
- Barna, M., Merghoub, T., Costoya, J. A., Ruggero, D., Branford, M., Bergia, A., Samori, B., Pandolfi, P. P., 2002. Plzf mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. *Dev Cell.* 3, 499-510.
- Barna, M., Pandolfi, P. P., Niswander, L., 2005. Gli3 and Plzf cooperate in proximal limb patterning at early stages of limb development. *Nature.* 436, 277-81.
- Bartunek, P., Karafiat, V., Dvorakova, M., Zahorova, V., Mandikova, S., Zenke, M., Dvorak, M., 1997. The Myb leucine zipper is essential for leukemogenicity of the v-Myb protein. *Oncogene.* 15, 2939-49.
- Bell, D. M., Leung, K. K., Wheatley, S. C., Ng, L. J., Zhou, S., Ling, K. W., Sham, M. H., Koopman, P., Tam, P. P., Cheah, K. S., 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 16, 174-8.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., de Crombrughe, B., 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 6698-703.
- Brand-Saberi, B., Seifert, R., Grim, M., Wilting, J., Kuhlewein, M., Christ, B., 1995. Blood vessel formation in the avian limb bud involves angioblastic and angiogenic growth. *Dev Dyn.* 202, 181-94.
- Buaas, F. W., Kirsh, A. L., Sharma, M., McLean, D. J., Morris, J. L., Griswold, M. D., de Rooij, D. G., Braun, R. E., 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 36, 647-52.
- Coates, M. I., Jeffery, J. E., Rut, M., 2002. Fins to limbs: what the fossils say. *Evol Dev.* 4, 390-401.



- Cohn, M. J., Tickle, C., 1999. Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. *Nature*. 399, 474-9.
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K. E., Wolgemuth, D. J., Pandolfi, P. P., 2004. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 36, 653-9.
- Coumoul, X., Deng, C. X., 2003. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 69, 286-304.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., Martin, G. R., 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*. 84, 127-36.
- Chan, D. C., Wynshaw-Boris, A., Leder, P., 1995. Formin isoforms are differentially expressed in the mouse embryo and are required for normal expression of *fgf-4* and *shh* in the limb bud. *Development*. 121, 3151-62.
- Chemes, H. E., Puigdomenech, E. T., Carizza, C., Olmedo, S. B., Zanchetti, F., Hermes, R., 1999. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod*. 14, 1811-8.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P., Simandl, B. K., Li, Y., Beachy, P. A., Fallon, J. F., 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol*. 236, 421-35.
- Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R., Hurle, J. M., 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol*. 257, 292-301.
- Cihak, R., 1972a. Ontogenesis of the skeleton and intrinsic muscles of the human hand and foot. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch*. 46, 5-194.
- Cihak, R., 1972b. Ontogenesis of the skeleton of the rat polydactyl foot. *Folia Morphol (Praha)*. 20, 106-9.
- Davies, J. M., Hawe, N., Kabarowski, J., Huang, Q. H., Zhu, J., Brand, N. J., Leprince, D., Dhordain, P., Cook, M., Morriss-Kay, G., Zelent, A., 1999. Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene. *Oncogene*. 18, 365-75.
- Doskocil, M., 1984. [Study of the development of the human knee joint]. *Anat Anz*. 157, 35-41.
- Dudley, A. T., Ros, M. A., Tabin, C. J., 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature*. 418, 539-44.
- Dylevsky, I., 1986. Growth of the human embryonic hand. *Acta Univ Carol Med Monogr*. 114, 1-139.
- Hui, C. C., Joyner, A. L., 1993. A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet*. 3, 241-6.
- Finley, W. H., Gustavson, K. H., Hall, T. M., Hurst, D. C., Barganier, C. M., Wiedmeyer, J. A., 1994. Birth defects surveillance: Jefferson County, Alabama, and Uppsala County, Sweden. *South Med J*. 87, 440-5.
- Fischer, S., Kohlhase, J., Bohm, D., Schweiger, B., Hoffmann, D., Heitmann, M., Horsthemke, B., Wiczorek, D., 2008. Biallelic loss of function of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) gene causes severe skeletal defects and genital hypoplasia. *J Med Genet*. 45, 731-7.
- Foster, J. W., 1996. Mutations in *SOX9* cause both autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Acta Paediatr Jpn*. 38, 405-11.
- Franz, T., Kothary, R., Surani, M. A., Halata, Z., Grim, M., 1993. The *Spotch* mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat Embryol (Berl)*. 187, 153-60.
- Froster-Iskenius, U. G., Baird, P. A., 1989. Limb reduction defects in over one million consecutive livebirths. *Teratology*. 39, 127-35.
- Furniss, D., Kan, S. H., Taylor, I. B., Johnson, D., Critchley, P. S., Giele, H. P., Wilkie, A. O., 2009. Genetic screening of 202 individuals with congenital limb malformations and requiring reconstructive surgery. *J Med Genet*. 46, 730-5.

- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Huang, R., Scaal, M., Christ, B., 2006. Expression pattern of BMPs during chick limb development. *Anat Embryol (Berl)*. 211 Suppl 1, 87-93.
- Goodman, F. R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., Giovannucci-Uzielli, M. L., Lapi, E., Majewski, F., McGaughan, J., McKeown, C., Reardon, W., Upton, J., Winter, R. M., Olsen, B. R., Scambler, P. J., 1997. Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 7458-63.
- Gewirtz, A. M., Calabretta, B., 1988. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science*. 242, 1303-6.
- Grim, M., 1970. Differentiation of myoblasts and the relationship between somites and the wing bud of the chick embryo. *Z Anat Entwicklungsgesch*. 132, 260-71.
- Grim, M., Halata, Z., 2000. Developmental origin of avian Merkel cells. *Anat Embryol (Berl)*. 202, 401-10.
- Grim, M., Christ, B., 1993. Neural crest cell migration into the limb bud of avian embryos. *Prog Clin Biol Res*. 383A, 391-402.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., Tabin, C. J., 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*. 118, 517-28.
- Healy, C., Uwanogho, D., Sharpe, P. T., 1996. Expression of the chicken Sox9 gene marks the onset of cartilage differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 785, 261-2.
- Hinrichsen, K. V., Jacob, H. J., Jacob, M., Brand-Saberi, B., Christ, B., Grim, M., 1994. Principles of ontogenesis of leg and foot in man. *Ann Anat*. 176, 121-30.
- Jeong, Y., Lee, J., Kim, K., Yoo, J. C., Rhee, K., 2007. Characterization of NIP2/centrobin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization. *J Cell Sci*. 120, 2106-16.
- Kang, S., Graham, J. M., Jr., Olney, A. H., Biesecker, L. G., 1997. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet*. 15, 266-8.
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Krejci, E., Kralova, J., Pajer, P., Snajdr, P., Mandikova, S., Bartunek, P., Grim, M., Dvorak, M., 2005. Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cell Mol Life Sci*. 62, 2516-25.
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Pajer, P., Kralova, J., Horejsi, Z., Cermak, V., Bartunek, P., Zenke, M., Dvorak, M., 2001. The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors. *Blood*. 98, 3668-76.
- Kozin, S. H., 2003. Upper-extremity congenital anomalies. *J Bone Joint Surg Am*. 85-A, 1564-76.
- Kren, V., 1975. Genetics of the polydactyly-luxate syndrome in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Univ Carol Med Monogr*. 1-103.
- Kotaja, N., Kimmins, S., Brancorsini, S., Hentsch, D., Vonesch, J. L., Davidson, I., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., 2004. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods*. 1, 249-54.
- Lefebvre, V., Li, P., de Crombrughe, B., 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J*. 17, 5718-33.
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Suring, K., Majewski, F., Tinschert, S., Grzeschik, K. H., Muller, D., Knaus, P., Nurnberg, P., Mundlos, S., 2003. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 12277-82.
- Lettice, L. A., Heaney, S. J., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., de Graaff, E., 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*. 12, 1725-35.
- Lewandoski, M., Sun, X., Martin, G. R., 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet*. 26, 460-3.

- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F., Chiang, C., 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 418, 979-83.
- Lu, P., Minowada, G., Martin, G. R., 2006. Increasing Fgf4 expression in the mouse limb bud causes polysyndactyly and rescues the skeletal defects that result from loss of Fgf8 function. *Development*. 133, 33-42.
- Macias, D., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Hurle, J. M., 1999. Regulation by members of the transforming growth factor beta superfamily of the digital and interdigital fates of the autopodial limb mesoderm. *Cell Tissue Res*. 296, 95-102.
- Malaterre, J., Carpinelli, M., Ernst, M., Alexander, W., Cooke, M., Sutton, S., Dworkin, S., Heath, J. K., Frampton, J., McArthur, G., Clevers, H., Hilton, D., Mantamadiotis, T., Ramsay, R. G., 2007. c-Myb is required for progenitor cell homeostasis in colonic crypts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 3829-34.
- Malaterre, J., Mantamadiotis, T., Dworkin, S., Lightowler, S., Yang, Q., Ransome, M. I., Turnley, A. M., Nichols, N. R., Emambokus, N. R., Frampton, J., Ramsay, R. G., 2008. c-Myb is required for neural progenitor cell proliferation and maintenance of the neural stem cell niche in adult brain. *Stem Cells*. 26, 173-81.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., Martin, G. R., 2008. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*. 453, 401-5.
- Martin, G. R., 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev*. 12, 1571-86.
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D., Hurle, J. M., 2008. Activin/TGFbeta and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev Biol*. 321, 343-56.
- Mortlock, D. P., Innis, J. W., 1997. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet*. 15, 179-80.
- Moutier, R., Toyama, K., Charrier, M. F., 1973. Hypodactyly, a new recessive mutation in the Norway rat. *J Hered*. 64, 99-100.
- Mrazkova, O., 1986. Blood vessel ontogeny in upper extremity of man as related to developing muscles. *Acta Univ Carol Med Monogr*. 115, 1-114.
- Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A. B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. A., Pietryga, D. W., Scott, W. J., Jr., Potter, S. S., 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*. 65, 677-89.
- Nieto, M. A., Patel, K., Wilkinson, D. G., 1996. In situ hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*. 51, 219-35.
- Niswander, L., 2003. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet*. 4, 133-43.
- Oh, I. H., Reddy, E. P., 1999. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*. 18, 3017-33.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N., Noji, S., 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*. 124, 2235-44.
- Ohuchi, H., Noji, S., 1999. Fibroblast-growth-factor-induced additional limbs in the study of initiation of limb formation, limb identity, myogenesis, and innervation. *Cell Tissue Res*. 296, 45-56.
- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y., Lewandoski, M., 2007. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. 134, 2359-68.
- Pettigrew, A. L., Greenberg, F., Caskey, C. T., Ledbetter, D. H., 1991. Greig syndrome associated with an interstitial deletion of 7p: confirmation of the localization of Greig syndrome to 7p13. *Hum Genet*. 87, 452-6.
- Post, L. C., Margulies, E. H., Kuo, A., Innis, J. W., 2000. Severe limb defects in Hypodactyly mice result from the expression of a novel, mutant HOXA13 protein. *Dev Biol*. 217, 290-300.

- Printz, M. P., Jirout, M., Jaworski, R., Alemayehu, A., Kren, V., 2003. Genetic Models in Applied Physiology. HXB/BXH rat recombinant inbred strain platform: a newly enhanced tool for cardiovascular, behavioral, and developmental genetics and genomics. *J Appl Physiol.* 94, 2510-22.
- Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H. S., Patel, U. C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Chandal, D., Blouin, J. L., Solanki, J. V., Grzeschik, K. H., Antonarakis, S. E., 1999. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet.* 65, 645-55.
- Rancourt, D. E., Tsuzuki, T., Capecchi, M. R., 1995. Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev.* 9, 108-22.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell.* 75, 1401-16.
- Sedmera, D., Novotna, B., Bila, V., Kren, V., 1998. The role of cell death in limb development of rats manifesting Lx allele on different genetic backgrounds. *Eur J Morphol.* 36, 173-81.
- Saunders, J. W., Jr., 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool.* 108, 363-403.
- Seda, O., Liska, F., Sedova, L., Kazdova, L., Krenova, D., Kren, V., 2005. A 14-gene region of rat chromosome 8 in SHR-derived polydactylous congenic substrain affects muscle-specific insulin resistance, dyslipidaemia and visceral adiposity. *Folia Biol (Praha).* 51, 53-61.
- Seichert, V., 1988. Significance of the differential growth, relative tissue shifts and the vascular bed in limb development. *Acta Univ Carol Med Monogr.* 125, 1-162.
- Shubin, N. H., Daeschler, E. B., Jenkins, F. A., Jr., 2006. The pectoral fin of *Tiktaalik roseae* and the origin of the tetrapod limb. *Nature.* 440, 764-71.
- Sitzmann, J., Noben-Trauth, K., Klempnauer, K. H., 1995. Expression of mouse *c-myc* during embryonic development. *Oncogene.* 11, 2273-9.
- Stricker, S., Verhey van Wijk, N., Witte, F., Brieske, N., Seidel, K., Mundlos, S., 2006. Cloning and expression pattern of chicken *Ror2* and functional characterization of truncating mutations in Brachydactyly type B and Robinow syndrome. *Dev Dyn.* 235, 3456-65.
- Summerbell, D., 1974. A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol.* 32, 651-60.
- Summerbell, D., Lewis, J. H., Wolpert, L., 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature.* 244, 492-6.
- Swanson, A. B., 1976. A classification for congenital limb malformations. *J Hand Surg Am.* 1, 8-22.
- Szedler, V., Grim, M., Halata, Z., Sieber-Blum, M., 2003. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol.* 253, 258-63.
- Talamillo, A., Bastida, M. F., Fernandez-Teran, M., Ros, M. A., 2005. The developing limb and the control of the number of digits. *Clin Genet.* 67, 143-53.
- Tchernev, V. T., Mansfield, T. A., Giot, L., Kumar, A. M., Nandabalan, K., Li, Y., Mishra, V. S., Detter, J. C., Rothberg, J. M., Wallace, M. R., Southwick, F. S., Kingsmore, S. F., 2002. The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med.* 8, 56-64.
- Thompson, A. J., Lummis, S. C., 2007. The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 11, 527-40.
- Tickle, C., 2004. The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech Dev.* 121, 1019-29.
- Tickle, C., Munsterberg, A., 2001. Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Curr Opin Genet Dev.* 11, 476-81.
- Towers, M., Tickle, C., 2009. Growing models of vertebrate limb development. *Development.* 136, 179-90.

- Wang, Y., Liska, F., Gosele, C., Sedova, L., Kren, V., Krenova, D., Ivics, Z., Hubner, N., Izsvak, Z., A novel active endogenous retrovirus family contributes to genome variability in rat inbred strains. *Genome Res.* 20, 19-27.
- Yanagisawa, H., Nagasawa, T., Kuramochi, S., Abe, T., Ikawa, Y., Todokoro, K., 1991. Constitutive expression of exogenous c-myc gene causes maturation block in monocyte-macrophage differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1088, 380-4
- Yi, S. E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V., Lyons, K. M., 2000. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development.* 127, 621-30.
- Yonei-Tamura, S., Endo, T., Yajima, H., Ohuchi, H., Ide, H., Tamura, K., 1999. FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. *Dev Biol.* 211, 133-43.
- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R., Lyons, K. M., 2005. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 5062-7.
- Zakany, J., Kmita, M., Duboule, D., 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science.* 304, 1669-72.
- Zakany, J., Duboule, D., 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev.* 17, 359-66.
- Zuzarte-Luis, V., Hurle, J. M., 2005. Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin Cell Dev Biol.* 16, 261-9.
- Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V., Gao, Q., 2005. Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J Cell Biol.* 171, 437-45.
- Zuniga, A., Zeller, R., 1999. Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarising region and control of posterior limb-bud identity. *Development.* 126, 13-21.

## 10. Seznam publikací autora a jeho příspěvek na nich

1) Karafiát V, Dvořáková M, Krejčí E, Králová J, Pajer P, Šnajdr P, Mandíková S, Bartůňek P., Grim M, Dvořák M: *c-Myb, a Key Hematopoietic Factor, Is Involved in the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Avian Neural Crest*; Cell. Mol. Life Sci. 62 (2005) 2516-2525

IF 4,812

Příspěvek P.Š. (spolu s E.K.): imunohistochemie - obr. 2 d,e,f ,  
elektroporace in ovo –obr. 4

2) Liska F\*, Snajdr P\*, Sedová L, Seda O, Chylíková B, Slámová P, Krejčí E, Sedmera D, Grim M, Krenová D, Kren V.: *Deletion of a conserved noncoding sequence in Plzf intron leads to Plzf down-regulation in limb bud and polydactyly in the rat.*; Dev Dyn. 2009 Mar;238(3):673-84

IF 3,018

\*oba první autoři se podíleli na této práci rovným dílem

Příspěvek P.Š. : všechny *in situ* hybridizace –obr. 5 a 7,  
srovnání vývoje končetiny u myši a potkana –obr.2  
zpracování a interpretace výsledků do podoby článku

3) Liska F, Gosele C, Rivkin E, Tres L, Cardoso MC, Domaing P, Krejčí E, Snajdr P, Lee-Kirsch MA, de Rooij DG, Kren V, Krenová D, Kierszenbaum AL, Hubner N.: *Rat hd Mutation Reveals an Essential Role of Centrobin in Spermatid Head Shaping and Assembly of the Head-Tail Coupling Apparatus.*; Biol Reprod. 2009 Aug 26

IF 3,469

Příspěvek P.Š.: imunohistochemie spermií, světelná mikroskopie - obr. 3 a 5

4) Šnajdr P, Grim M, Liška F. *HOX geny a vývoj končetin v klinické medicíně i v experimentu.* ; Časopis lékařů českých 2010; 149(1):4-9

Příspěvek P.Š.: zpracování a interpretace dat do podoby článku

5) Liška F, Šnajdr P, Stricker S, Gosele C, Křenová D, Hubner N. : *Impairment of Sox9 expression in limb buds of rats homozygous for hypodactyly mutation*, Folia Biologica (Praha). 2010;56(2):58-65.

IF 1,14

Příspěvek P.Š.: zpracování a interpretace výsledků do podoby článku

## 11. Příloha 1

### 11.1. mRNA *in situ* hybridizace

#### *In situ* hybridizace v celých embryích (Whole mount *in situ* hybridisation)

Tento postup je modifikací protokolu dle Nieto et al. 1996

#### **Fixace – odběr – RNAase free !!!**

4% PFA v PBT

na kolíbce ve 4°C, fixativum na noc vyměnit

ON/4°C

všechny další operace na houpačce

#### **Praní**

PBT

led 2x10 min

#### **Dehydratace:**

50% MetOH v PBT

led 10min

100% MetOH na ledu cca 10min

led

2x10min

#### **Bleaching – bělení embryí**

6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v MetOH = 1 díl peroxidu +4 díly MetOH

30min

#### **Praní**

100% MetOH

led 10 min

#### **1.den (nejlépe ve čtvrtek)**

**Rozdělení embryí podle stejných stádií do skleniček či 2ml Epp**

#### **Rehydratace**

50% MetOH v PBT

led 10 min

PBT

led 10min

#### **Natrávení Proteinase K**

Proteinasa K 20ug/ml v PBT (na 1 ml PBT – 1ul PRT- K c=20mg/m)

RT, HH 12-25 = 20minut, cca 1.5min/stadium

pokojova teplota

#### **Praní**

1x PBT

led 5minut

#### **Refixace**

4% PFA v PBT s glutaraldehydem 0.25%

led 20minut

na 1 ml PFA – 10ul GA 25%

zapnout hybridizační blok na 70°C

#### **Praní**

1xPBT

led 2x5minut

#### **Příprava embryí na hybridizaci**

rozdělíme a přelijeme do 2ml Epp dle sond

#### **Prehybridizace**

**1. prehybridizace** v bloku vyhřátém na 70°C

do každé zkumavky přidáme 1.5ml hybridizačního roztoku a necháme embrya klesnout

2hod lépe přes noc

výměna hybridizační směsi

#### **2.den**

přidáme ke 2. prehybridizačnímu roztoku **próbu ve finální konc. 50ng/ml**,

**3. - 4.den – hybridizace** (přes vikend v bloku na kolébce) v bloku 65°C

### **5.den (pondělí)**

Zapneme vodní lázeň na 75°C

Pracujeme už bez kontroly RNA , ale v rukavicích – pozor na CHAPS!

#### **Posthybridizační praní**

2xSSC	70°C	20min
2xSSC+0.2%CHAPS	70°C	3x20min
0.2xSSC+0.2%CHAPS	70°C	3x20min

(tepelně inaktivujeme příslušné množství séra při 65°C 5min, ve vodní lázni)

#### **Praní**

KTBT	RT	2x10 min
------	----	----------

#### **Preblokace serem**

10-25%(20%) kozím sérem v KTBT	RT	2-4hod
--------------------------------	----	--------

zároveň absorbujeme anti DIG 1:5000 - 2500 v preblokačním roztoku, houpeme na ledu

**Aplikace anti digoxigeninu značeného AP** ON, houpat 4°C

### **6. den (úterý)**

#### **Praní po protilátce**

KTBT	RT	5x	2hod
KTBT	4°C na houpačce		ON

### **7.den (středa)**

#### **vybarvování se substráty pro AP**

NTMT pufr	RT	2-15 minut
-----------	----	------------

Barvicí roztok:

10% roztok dimethylformamidu v NTMT

na každý ml roztoku přidáme 4,5 ul NBT a 3,5 ul BCIP

Embrya přelijeme do skleněných lahvíček do každé přidáme 2ml barvicího roztoku, ve tmě vybarvovat 30 minut až 1 den, na orbitální třepačce.

Po vybarvení embrya, 3x vypereme v AP pufru, zafixujeme 4% PFA v PBS a uložíme při 4°C.

#### **Roztoky a chemikálie pro ISH**

všechny pracovní roztoky se ředí v DEPC vodě.

pH nastavujeme 0,1M NaOH nebo 0,1M HCl